

TESE DE DOUTORAMENTO
CAMBIOS BIOQUÍMICOS POSTMORTEM DE
ESPECIES PESQUERAS GREGARIAS DE INTERÉS
COMERCIAL DE LA COSTA GALLEGA.
REPERCUSIÓN TECNOLÓGICA Y CONTROL DE
CALIDAD EN SUS PRODUCTOS
TRANSFORMADOS.

CARLOS JOSE RODRIGUEZ VAZQUEZ

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN BIODIVERSIDADE E
CONSERVACION DO MEDIO NATURAL

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2018





DECLARACIÓN DO AUTOR/A DA TESE
CAMBIOS BIOQUÍMICOS POSTMORTEM DE ESPECIES PESQUERAS
GREGARIAS DE INTERÉS COMERCIAL DE LA COSTA GALLEGA.
REPERCUSIÓN TECNOLÓGICA Y CONTROL DE CALIDAD EN SUS
PRODUCTOS TRANSFORMADOS.

D./Dna. ..Carlos José Rodríguez Vázquez.

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.

De selo caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.

A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide coa versión enviada en formato electrónico.

Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.

En Santiago, 4 de Mayo de 2018.

Asdo....Carlos J. Rodríguez..





AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR / TITOR DA TESE
CAMBIOS BIOQUÍMICOS POSTMORTEM DE ESPECIES PESQUERAS
GREGARIAS DE INTERÉS COMERCIAL DE LA COSTA GALLEGA.
REPERCUSIÓN TECNOLÓGICA Y CONTROL DE CALIDAD EN SUS
PRODUCTOS TRANSFORMADOS.

D./Dna. M^a Cruz Pascual López...

INFORMA:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D/Dna. Carlos José Rodríguez Vázquez, baixo a miña dirección, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

En ..Santiago., 4 de Mayo de 2018

Asdo...M^a Cruz Pascual López.



**A mi mujer, Dolores, y a mis hijos, Marina y Martín, por su
paciencia y cariño.**





AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer en esta memoria, por motivos varios, en primer lugar a mis padres, Pepe y Lola, por su eterno apoyo y cariño, sin los cuales no estaría hasta donde he llegado, trabajando en lo que realmente me gusta. También a mis hermanos, Cris y Alberto. Y como no, a mis padres políticos, Alejandro y Mary, que con gran esfuerzo hacen parte de mis labores paternales.

A mi tutora y amiga, M^a Cruz Pascual, que por su más que paciencia con este trabajo, ha sido como una segunda madre.

Aquellas dos personas que ya no están aquí, y sin ellos en parte esta tesis no vería la luz: mi abuelo Benjamín, por su apoyo económico en mis peores momentos, y al buen Dr. Carlos Barros, una eminencia, agradable y simpático donde los haya, que me curtió en temas legislativos y un apoyo en mis primeras publicaciones.

No quisiera olvidarme de mis compañeros y amigos de mi época universitaria, que en cierto modo les debo parte de mi tesis, como Rebeca Pais, María Corcuera, Isidro Besteiro, J. Luís Collazo, y Ventura. A Manolo (Troglo), que supo hacer lo contrario, relajar el coco en esas partidas de tute, y como buen bombero, aprender a apagar “fuegos” futuros.

A mis compañeros actuales de trabajo, ¡que menos!, que me han hecho más agradable mi estancia en el “*extranjero*”, que me han acogido en esos *juerness* de relax para calmar la mente, y que han estado ahí ... “*acaba esa tesis*” en lo terrenal: Beatriz Sanmartín, M^a Nieves Rodríguez, Pablo Sotelo, Rebeca Vázquez, y demás compinches ... Francisco P. Sabín, José L. Meniño, Miguel Silva y J. M. Alonso.

A esos otros amigos y compadres, que han estado insistiendo en que no abandone el barco, en éste y otros muchos temas relacionados con la I+D+i, Javier Iglesias y Xosé Lois Otero (el señóc).

Agradecer a Amalia Fernández, Alfredo Veiga y Concepción Blanco de Pescados Rubén por el suministro de ejemplares de sardina

para los últimos estudios realizados durante 2016 y para desarrollar los ensayos con *Clostridium* en conservas.

Esta tesis ha sido realizada en parte gracias al proyecto XUGA20005A92 de la Consellería de Educación y Ordenación Universitaria de la Xunta de Galicia.

A todos ellos ... gracias.



ABREVIATURAS:

μg/g: microgramo por gramo
μmol/g: micromoles por gramo
ADP: adenosine difosfato
AGM: agmatina
AMP: adenosine monofosfato
ATP: adenosín trifosfato
AB: aminas biógenas
BVT: bases volátiles totales
CAD: cadaverina
CG: cromatografía gaseosa
CVS: compuestos volátiles azufrados.
CLAE: cromatografía líquida de alta resolución
DMA: dimetilamina
EAP: envasado en atmósfera protectora
FFA: ácidos grasos libres
g: gramo
HIS: histamina
Hx: hipoxantina
HxR: inosina
IMP: inosina monofosfato
kg: kilogramo
l: litro
MAP: envasado en atmósfera protectora
MDA: malondialdehído
ml: mililitro
MMA: monometilamina
MPa: megapascals
NIR: infrarrojo cercano
OTMA: óxido de trimetilamina
PCr: fosfato de creatina
PHE: β-feniletilamina
ppm: partes por millón

PUT: putrescina
QIM: quality index method
SPA: espermina
SPN: espermidina
TBA: ácido 2-tiobarbitúrico
TMA: trimetilamina
TRP: triptamina
TVB: bases volátiles totales
TYR: tiramina
UE: unión europea
ufc/g: unidades formadoras de colonias por gramo
WHC: capacidad de retención de agua.



RESUMEN.

Actualmente, ciertas especies pelágicas como la sardina, de interés comercial, están sufriendo una caída importante en sus capturas durante esta última década, lo cual incrementa su valor en el mercado, pasando a ser un producto *delicattessen*. Sin embargo, el conocimiento científico de *Sardina pilchardus* es escaso en el campo nutricional, en relación a parámetros de calidad en fresco, y sobre todo relacionado con sus conservas.

El objetivo principal es estudiar y comprender los cambios bioquímicos sufridos por las especies pelágicas *Sardina pilchardus* y *Trachurus trachurus*, capturadas frente a las costas gallegas, desde su captura hasta su transformación en conservas. Se establecen los siguientes ensayos: 1) mejora de tratamiento del pescado a bordo; 2) estudio de vida útil de sardina almacenada en atmósfera protectora (MAP); 3) estudio del proceso de elaboración de conservas de sardina y su efecto en su composición bioquímica, y 4) efecto del proceso de elaboración de conservas en los parámetros de frescura clásicos y su validación en producto final.

Se aplica el método de conservación a bordo conocido como Agua de Mar Enfriada (AME), no usado por la flota pesquera, para preservar la frescura del jurel. El método muestra a nivel sensorial una mejora de sus cualidades intrínsecas, así como presentar valores bioquímicos de alteración más bajos frente al sistema tradicional durante su posterior almacenamiento en hielo. El índice de TBA (1,5 mg MDA/kg) y Valor H (5%) destacan como parámetros de frescura. La presencia de cadaverina (CAD) y agmatina (AGM) indican un proceso de alteración bacteriana en refrigeración. El jurel es una especie generadora de IMP.

La composición de la sardina varía de forma acusada en la tasa de lípidos, cuyo máximo depende del año de estudio, entre verano y otoño, condicionado a factores ambientales. Se observa un cambio

importante en la tasa de los ácidos grasos esenciales EPA y DHA, que dominan el 30% de la fracción de estos ácidos grasos. Estos niveles se alternan según la estación de captura para una misma talla. El OTMA depende de la época de captura, con valores más altos en primavera.

Respecto al empleo de MAP en tronquitos de sardina, el uso de tasas medias de CO_2 incrementa la vida útil del pescado en 2-3 días bajo condiciones de refrigeración. Los parámetros de TBA y la presencia de determinadas aminas biógenas dominantes (CAD y AGM) son indicadores de alteración, con 2 mg MDA/kg y 5-8 ppm, respectivamente. Los catabolitos del ATP, Valor H y Valor K_i , son indicadores de su grado de frescura, proponiendo un valor límite de 10% y 40%, respectivamente. La sardina es también una especie formadora de IMP.

El proceso de conservas afecta a la composición inicial de la sardina. El OTMA se descompone térmicamente a TMA, y en menor tasa, DMA. La fracción grasa llega a perder hasta un 75% de sus ácidos grasos omega-3 más interesantes (EPA y DHA). Los parámetros de frescura/alteración clásicos, como BVT, TBA y TMA no pueden ser usados como tales en el producto en conserva, ya que existe una generación excesiva en conserva por el tratamiento térmico. Respecto a la generación y presencia de aminas biógenas no volátiles en materia prima, tras la esterilización se producen pérdidas leves, por lo que se propone la presencia de AGM y CAD (como aminas dominantes), como indicadores de alteración (5-8 ppm peso seco libre de grasa como límite). Estas pérdidas también se observan con el IMP durante el proceso de conservas. La formación de Hx y HxR en materia prima es lineal en el tiempo de almacenamiento refrigerado, y se mantienen ligeramente en producto final. Por ello, se propone el uso de Valor H como parámetro indicador de frescura de la materia prima usada para elaboración de conservas de sardina (11-13%) en condiciones optimizadas (se observa un ligero incremento con la temperatura de esterilización). Algo similar ocurre con el valor K_i , superior en conserva pero con la misma tendencia ascendente que la mostrada por la materia prima. En el límite de aptitud sensorial en fresco (4 días, Valor K_i de 30%), el Valor K_i máximo como parámetro de frescura para la conserva sería del 40%. Valor de letalidad F_0 de 1,2

a 110°C es suficiente para eliminar inóculos de *Clostridium botulinum* tipo E (10^7 ufc/g), pero sus características sensoriales no son adecuadas; con valores F_0 de ~3,0 a la misma temperatura, se obtiene un producto de calidad sensorial máximo, y el riesgo potencial de *C. botulinum* nulo.

ABSTRACT

Actually, pelagic fishing species of commercial interest suffer an important fall of their catches during this last decade, which increases their economic value in the market, like the pilchard, considering itself a delicatessen product. However, the scientific knowledge of *Sardina pilchardus* is insufficient in the nutritional field and in relation to quality parameters in fresh, and especially related to their canned products.

The main objective is to study and understand the biochemical changes suffered by the pelagic species *Sardina pilchardus* and *Trachurus trachurus*, caught off the Galician coast, from capture to processing into canned fish. The following tests are established: 1) improvement of fish treatment on board; 2) study of shelf life of sardine stored in modified atmosphere packaging (MAP); 3) study of the sardine canning process and its effect on biochemical composition, and 4) effect of the canning process on the classic freshness parameters and its validation in the final product.

The onboard preservation method known as Chilled Seawater (AME), not used by the fishing fleet, is applied to preserve the freshness of the horse mackerel. The method shows at sensory level an improvement of its intrinsic qualities, as well as presenting biochemical alteration values lower compared to the traditional system during its subsequent storage on ice. The TBA index (1.5 mg MDA/kg) and H value (5%) stand out as freshness parameters. The presence of cadaverine (CAD) and agmatine (AGM) indicate a process of bacterial spoil in refrigeration conditions. Horse mackerel is IMP forming species.

The composition of the pilchard varies sharply in the lipid rate, whose maximum depends on the year of study, between summer and autumn, conditioned to environmental factors. There is a significant change in the rate of essential fatty acids EPA and DHA, which dominate 30% of the fraction of these fatty acids. These levels alternate according to the seasonal capture, for the same size. The TMAO depends on the caught time, with higher values in spring.

Regarding the use of MAP in sardine pieces, the use of average CO₂ rates increases the useful life of the fish in 2-3 days under refrigeration conditions. The parameters as TBA and the presence of certain dominant biogenic amines (CAD and AGM) are good spoilage indicators, with 2 mg MDA/ kg and 5-8 ppm, respectively. The catabolites of ATP, the H Value and K_i Value are freshness indicators, proposing a limit value of 10% and 40%, respectively. Pilchard is also an IMP-forming species.

The canning process affects the initial composition of the pilchard. The TMAO is thermally decomposed to TMA, and at a lower rate, DMA. The fat fraction gets to lose up to 75% of its most interesting omega-3 fatty acids (EPA and DHA). The classic freshness / spoil parameters, such as TVB, TBA and TMA can not be used as such in the canned product, since there is an excessive generation in canned pilchard, by the thermal treatment. Regarding the generation and presence of non-volatile biogenic amines in raw material, after the sterilization there are slight losses, so the presence of AGM and CAD (as dominant amines) is proposed as spoilage indicators (5-8 ppm weight dry fat-free as limit). These losses are also observed with the IMP during the canning process. The formation of Hx and HxR in raw material is linear in the refrigerated storage time, and they remain slightly in the final product. For this reason, the use of H Value is proposed as a freshness parameter of the raw material used for canned pilchards (11-13%) under optimized conditions (a slight increase is observed with the sterilization temperature). The K_i value shows a similar behavior, higher in canned product, but with the same upward trend as that shown by the raw material. At the sensorial freshness limit (4 days, K_i Value of 30%), the maximum K_i value as a freshness parameter for the canned pilchard would be 40%. Lethality value, F₀

of 1.2 to 110°C, is adequate to eliminate *Clostridium botulinum* type E inoculum (10^7 cfu / g), but its sensory characteristics are not good; with F_0 values of ~ 3.0 at the same temperature, a product with maximum sensory quality is obtained, and the potential risk of *C. botulinum* nil.





INDICE

1. INTRODUCCION	3
1.1. El pescado como alimento. Las especies pelágicas de interés comercial.	3
1.2. La conservación del pescado	11
1.2.1. El pescado fresco	13
1.2.1.1 Sistema de conservación tradicional.	13
1.2.1.2 Conservación en atmósferas protectoras (MAP).	20
1.2.1.3 Sistemas de conservación emergentes.	22
1.2.1.4 Sistema de conservación química.	26
1.2.2. Los productos pesqueros transformados. Las conservas.	29
1.2.2.1 Breve Historia de las conservas.	32
1.2.2.2. La elaboración de conservas.	33
1.3. La calidad del pescado. El problema del concepto de calidad.	45
1.4. Parámetros de frescura utilizados en pescado.	48
1.4.1. Degradación <i>postmortem</i> del pescado.	49
1.4.2. Parámetros sensoriales.	60
1.4.3. Parámetros químicos.	62
1.4.4. Otros métodos de frescura.	77
1.5. Aplicación de los parámetros de frescura a conservas.	81
2. OBJETIVOS	87
3. MATERIALES Y METODOS	91
3.1. Materia prima.	91
3.2. Materiales, Reactivos y equipos instrumentales.	93
3.3. Metodología analítica	98

3.3.A. Métodos Biométricos	98
3.3.B. Análisis Fisicoquímicos	99
3.3.C. Análisis microbiológico.	107
3.3.D. Análisis organoléptico.	108
3.3.E. Tratamiento estadístico.	131
3.4. Diseño experimental.	132
3.4.1. Efectividad de la conservación del pescado a bordo con Agua de Mar Enfriada.	132
3.4.2. Envasado y almacenamiento del pescado en Atmósferas Protectoras. Estudio de vida útil.	141
3.4.3. Elaboración de conservas.	146
3.4.3.1. I Experimento. Efecto del tiempo y la temperatura de esterilización sobre la composición química de la sardina.	151
3.4.3.2. II Experimento. Comportamiento de los compuestos de degradación en sardina durante el almacenamiento refrigerado y la elaboración de conservas.	154
3.4.3.3. CASOS PRÁCTICOS.	156
4. RESULTADOS Y DISCUSION	161
4.1. Datos biométricos y de composición elemental de la sardina capturada entre los años 1992 y 1994, y 2016.	161
4.2. Efectividad de la conservación del pescado a bordo con Agua de Mar Enfriada.	174
4.3. Envasado y almacenamiento de sardina en Atmósferas Protectoras (MAP). Estudio de vida útil.	198
4.3.1. Refrigeración I. Sardina envasada a vacío bajo refrigeración a +4°C.	198
4.3.2. Refrigeración II. Sardina envasada en atmósferas protectoras (MAP) en refrigeración, entre +1° y +4°C.	214
4.4. CONSERVAS. Efecto del proceso tecnológico de elaboración de conservas de sardina sobre la integridad de la materia prima.	287

4.4.1. Experimento I. Efecto del tiempo y la temperatura de esterilización sobre la composición química de la sardina y su inocuidad.	287
4.4.2. Experimento II. Comportamiento de los compuestos de degradación en sardina durante el almacenamiento refrigerado y la elaboración de conservas.	324
4.4.3. Casos prácticos.	380
5. CONCLUSIONES.	411
6. BIBLIOGRAFIA	419





INTRODUCCION





1. INTRODUCCION

1.1. EL PESCADO COMO ALIMENTO. LAS ESPECIES PELÁGICAS DE INTERÉS COMERCIAL.

El pescado es una importante y especial fuente de proteínas para la alimentación humana. Para el desarrollo y mantenimiento corporal, el ser humano precisa energía (que es aportada por los glúcidos y las grasas) y proteína (Tabla 1); adicionalmente para un perfecto funcionamiento del organismo requiere de una serie de compuestos (vitaminas) y elementos o sales minerales, que forman parte de enzimas, hormonas, pigmentos, etc. (García-Rollán, 1990; del Castillo, 2006).

Tabla 1. Composición media de los constituyentes principales (%) de diferentes productos frescos de la pesca, de interés en el mercado español.

Especie	Agua	Proteína	Grasa	Carbohidratos
Sardina	68	21	11	-
Bacaladilla	79	18	2	-
Atún	59	26	13	1
Mejillón	65	23	4	8
Pulpo	62	30	3	5
Gamba	79	20	0,7	-
Langosta	67	26	2	5

Fuente: elaboración propia, tomado de Hui y col. (2006).

El pescado posee una proporción de proteína similar a la de otros productos cárnicos pero destaca sobre todo por su fácil y rápida asimilación y metabolización, factores que son dependientes de la estructura y composición aminoacídica de esta proteína (Ozyurt y Polat, 2006); este hecho hace que sean una fuente de proteínas especial y nutritiva al poseer todos los aminoácidos esenciales requeridos por el ser humano (Li y col., 2007). Además posee un colágeno más friable durante la digestión, así como durante los procedimientos culinarios tradicionales (se solubiliza a partir de los +60°C), al contrario del colágeno de los mamíferos, cuyo consumo

lleva a veces a digestiones pesadas (Tahergorabi y Jaczynski, 2016; Pal y Suresh, 2016). Los niveles medios de proteína en el pescado se hallan entre 17-20% (Love, 2001).

Por otro lado, la grasa es altamente poliinsaturada, lo cual en un factor positivo como producto alimenticio, ya que desde hace pocas décadas se conocen con precisión los efectos beneficios del consumo de este tipo de grasa en el organismo humano, sobre todo respecto a la prevención de enfermedades cardiovasculares, al estar íntimamente ligados con la regulación de los niveles de colesterol en el torrente sanguíneo (Hunter y Roberts, 2000; Kris y col., 2002; Tou y col., 2007; Soen y col., 2007). El pescado posee la serie de ácidos grasos esenciales para el ser humano, muy ricos en los de la serie ω -3 y ω -6. El contenido global de grasa en el pescado es variable en muchas especies (Covington, 2004; Brea y col., 2012), sobre todo en las denominadas especies grasas o azules, con valores que oscilan desde el 1% hasta un 22%, variabilidad que responde al ciclo vital o reproductor del animal, y esta variabilidad es inversamente proporcional al contenido en agua (60-78%).

La cantidad de glúcidos se hallan a nivel de trazas como glucógeno en el caso de especies de túnidos, y más destacables al tiempo que variable según la época del año en el caso de moluscos y algunos crustáceos (Hui y col., 2006; Veda y Fukami, 2017). En cuanto a vitaminas destaca por su contenido en vitamina A, Niacina (Anderson y col., 1994; Lall y Parazo, 1999) y respecto a sales minerales destaca por su contenido en yodo y selenio (Lall, 1999; Mohamad y Yusuf, 2016).

Aunque a nivel nutricional carecen de interés, hay una serie de compuestos, algunos específicos del pescado, que tienen un papel importante en el aroma y sabor del pescado, y que responden a una serie de características sensoriales de índole comercial. Es el caso del contenido de Oxido de Trimetilamina, Betaínas, Creatina, Ácidos y Aldehídos de cadena corta, etc., pero algunos de ellos se están vinculando a determinadas alteraciones en el organismo humano, como es el caso del sistema circulatorio (Fuke y Konosu, 1991; Haard, 1999; Hui y col., 2006; Nagata y col., 2015; Yazdekhesti y col., 2016; Farabegoli, 2016; Summers y col., 2017).

Es pues evidente que el pescado es un alimento con un alto valor nutricional, muy superable a cualquier otro alimento a base de músculo (ovino, vacuno, avícola, etc).

¿Pero qué entiende el consumidor por pescado?. Hay un uso popular en aplicar el término Pescado a los peces mientras que los invertebrados se conocen por Mariscos. Sin embargo, por **Pescado** se entiende “*todo animal acuático (marino y dulceacuícola) salvaje o procedente de la acuicultura, vertebrado (salvo reptiles, anfibios y mamíferos acuáticos) e invertebrado que es sustraído de su medio natural con destino a un consumo humano*” (BOE, 1984).

Con el término Productos del Mar o Productos Pesqueros, a parte de los mencionados, se incluyen sus partes (patas, filetes, lomos, ...) o su transformación (conserva, ahumado, ...) y las algas, siempre y cuando sean de uso alimentario.

Para evitar esta confusión, dado que el presente trabajo trata de especies piscícolas, se hará mención a peces y cuando se mencione la palabra pescado, se hará referencia en todo momento a estas mismas especies de peces, empleando la palabra pescado por tradicionalidad. Pero los peces son diferentes entre ellos en muchos aspectos; de hecho el consumidor sabe que ciertas especies duran más durante su almacenamiento en la nevera que otras, lo cual responde a factores fisicoquímicos (actividad enzimática, cantidad de grasa, contenido acuoso, cantidad inicial de OTMA y NH_3) y morfológicos (grosor de la piel, cantidad de mucus, estructura muscular, etc.). Así, en función de su contenido graso, se diferencian especies grasas (o azules), y especies magras (o blancas). En este trabajo, son de interés las especies pelágicas, que son aquellos peces que viven en los primeros 50-100 m de profundidad en la columna de la masa de agua del océano, y más concretamente los localizados en el área nerítica, sobre la plataforma continental. Las especies pelágicas suelen asociarse a las especies azules o grasas, si bien, en muchos casos no tienen correspondencia como es el caso de Japuta (*Brama brama*) que no es una especie grasa, aunque popularmente esta grasa se asocia a la presencia de unos parásitos tremátodos intramusculares (Besteiro y col., 1999). Las especies pelágicas, por lo general, viven en grandes cardúmenes, alejados de la costa a la que se acercan para desovar, son

ágiles nadadores, con colas bifurcadas o en media luna y silueta hidrodinámica. Poseen una proporción de músculo rojo importante respecto al total de masa muscular, que es la que se emplean para los continuos movimientos, donde se localiza el órgano sensorial para detectar presas o predadores, y circulación de nutrientes entre otras funciones (Venugopal y Shahidi, 1996; Kinsey y col., 2011). Su zona dorsal suele ser de colores verdeazulados, oscuros, y la zona ventral de tono plateado, colores para pasar inadvertidos a los predadores.

De los peces pelágicos capturados frente a las costas gallegas destacan ciertas especies por su interés comercial para consumo humano, ya sea en fresco o en producto transformado. Así, dentro del orden de los clupeiformes, destacan la sardina (*Sardina pilchardus*) y el boquerón (*Engraulis encrasicolus*), en la familia de los carángidos el jurel (*Trachurus trachurus*) y de los escómbridos el atún blanco (*Thunnus alalunga*), el atún rojo (*Thunnus thynnus*), el listado (*Katsuwonus pelamis*), la caballa (*Scomber scombrus*) y verde (*Scomber japonicus*). Otras especies importantes, aunque de menor volumen de capturas y económico son la japuta (*Brama brama*) y la aguja (*Belone belone*). De todas estas especies, la más sedentaria en nuestras costas es la sardina. El resto realiza grandes migraciones, a veces transoceánicas, como en el caso de los túnidos y escómbridos, por lo que sus capturas tienen lugar en determinadas épocas conocidas como Costeras o Campañas en el Mar Cantábrico. El boquerón también realiza migraciones desde la costa de la Bretaña francesa (Otoño-Invierno) hasta la confluencia del Mar Cantábrico y Océano Atlántico (Primavera-Verano). El jurel adulto (stock Norte) realiza migraciones en Otoño hasta las costas del Mar del Norte, regresando hacia la primavera a las costas gallegas; sin embargo, la plataforma gallega sostiene una población más o menos constante de jurel a lo largo del año, juveniles en época invernal y adultos en la estival (Villamayor y col., 1998).

En la Tabla 2 se expone el método de captura para cada especie pelágica de interés comercial en la región noroeste de la Península Ibérica.

Tabla 2. Método, época y zona de captura de las especies pelágicas de interés comercial en la región noroeste de la Península Ibérica, con destino a consumo humano.

Especie	Arte de pesca	Epoca de pesca	Zona de captura
<i>Sardina pilchardus</i>	Cerco	Todo el año	Area nerítica
<i>Engraulis encrasicolus</i>	Cerco	Abril-Julio	Area nerítica
<i>Trachurus trachurus</i>	Cerco	Todo el año	Area nerítica
<i>Thunnus thynnus</i>	Arrastre		
	Cerco	Junio-Agosto	Area oceánica
	Curricán		
<i>Thunnus alalunga</i>	Cerco	Junio-Agosto	Area oceánica
	Cerco		
	Curricán		
<i>Katsuwonus pelamis</i>	Curricán	Junio-Agosto	Area oceánica
<i>Scomber scombrus</i>	Cerco	Invierno-primavera	Area nerítica
<i>Scomber japonicus</i>	Cerco	Invierno-primavera	Area nerítica
<i>Brama brama</i>	Palangre de superficie	Todo el año	Area oceánica
<i>Belone belone</i>	Cerco	Verano	Area nerítica

Fuente: elaboración, propia. Información aportada por diferentes cofradías pesqueras gallegas.

La sardina, jurel, y especies de escómbridos, consideradas como especies pelágicas, también responden a una migración diaria en la vertical de la masa acuática, por lo que en parte son capturadas por artes de arrastre de fondo, en tal caso, su destino final es para usar de cebo en otras pesquerías o para elaborar harinas de pescado para alimentación animal.

La Sardina (*Sardina pilchardus*) es una de las especies valoradas en la dieta española, tanto culturalmente como gastronómicamente, principalmente en Galicia, siendo una de las especies más apreciadas para su elaboración en conserva.

Su captura se ajusta alrededor del 80% en el Mar Mediterráneo (Carrera y Porteiro, 2003), mientras que en el Océano Atlántico y Mar Cantábrico, sus capturas descendieron drásticamente desde los años 80 (Pastor y col., 1986; Punzón and Gancedo, 1998; ANFACO, 2002), siendo las causas no sólo asociadas a la pesca, a las propias características y sensibilidad de la especie (cuya vida máxima se sitúa entre 3 y 5 años; Lotina, 1985), también al cambio climático, que afecta al alimento, el descenso de biomasa, el dominio de corrientes,

etc. (Guisande y col., 2001; Guisande y col., 2004a; Guisande y col., 2004b; Santos y col., 2007; Ramos y col., 2009).

A raíz de estos registros, se vienen estableciendo unas vedas partir del año 2000 en Galicia y otras Comunidades Autónomas del Mar Cantábrico dadas las drásticas caídas de capturas de años anteriores, vedas comprendidas entre finales de enero y mediados de abril en años siguientes; si bien, en esta última década (Imagen 1), sus capturas son muy bajas pese a la recuperación del stock parcial cantábrico, alcanzando capturas mínimas a finales del año en 2015, muy inferiores a las obtenidas en el año 2000 para el mismo periodo (Xunta, 2016).

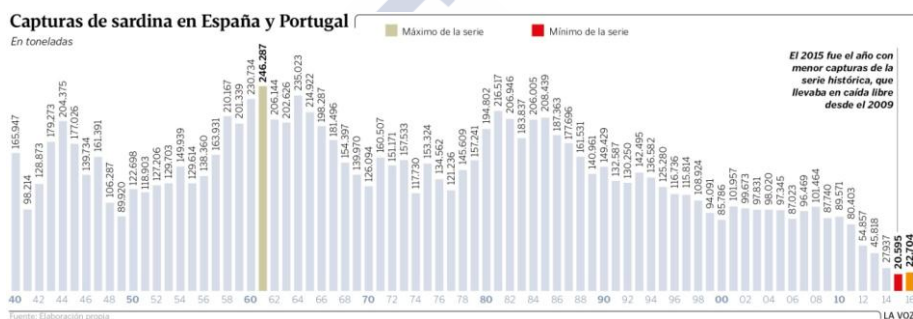


Imagen 1. Capturas de sardina del noroeste peninsular. Fuente: La Voz de Galicia (diciembre, 2017)

Las fluctuaciones de capturas anuales de sardina en el norte peninsular se han venido constatando desde los años 40 del siglo XX, poniendo de manifiesto la existencia de crisis cíclicas por la caída de descargas anuales de esta especie, como entre 1945-1957, 1962-1967, y especialmente desde 1985, y no siempre achacables a la sobreexplotación por parte de la flota (González-Laxe, 1977; Punzón y col., 1999), como se puede deducir a raíz de los controles llevados a cabo desde entonces por la diferentes Administraciones, lo cual es razonable pensar en cambios principalmente climáticos que afecten a los nutrientes de la zona y por tanto al reclutamiento de la especie (Porteiro y col., 1996; Casas y col., 1997; Lavin y col., 2000; Alvarez-Prado, 2001).

Desde 2012, el consumo de conservas de pescado en España ha sufrido un ligero incremento (17,4% en 2016) con respecto a otros productos pesqueros, que por el contrario han sufrido drásticas caídas en su consumo. El principal producto de la pesca en conserva consumido en 2016 han sido las preparaciones de túnidos ($102,2 \times 10^6$ kg), seguido por las de mejillón ($12,4 \times 10^6$ kg) y sardina ($11,3 \times 10^6$ kg); en este mismo año, el consumo de sardina fresca en España ha sido de $30,8 \times 10^6$ Tm (Martín, 2017; Marqués, 2017).

En base a estos datos y los obtenidos de capturas para *Sardina pilchardus* en la Comunidad Autónoma de Galicia (Xunta, 2016), donde se elaboran la mayor parte de las conservas de esta especie, es obvio que para la producción de conservas se requiere de materia prima foránea a esta comunidad de áreas más productivas (mar Mediterráneo) o adquirir especies afines, y ya sea su recepción en estado congelado o fresco, donde la manipulación efectuada en las diferentes zonas de pesca y la distancia al punto de transformación, el tipo de transformación (sistema de congelado), las condiciones de almacenamiento, ... no controlables, favorecen que en la Industria Conservera se realicen recepciones de materia prima con diferentes grados de frescura/idoneidad (López-Capont, 2001), algo similar a lo indicado por Calanche y col. (2013) para sardina recibida en factoría, pero que gracias a los tratamientos tecnológicos aplicados, los cambios sensoriales (relacionados con drásticos cambios físicos y químicos intrínsecos durante el procesado), hacen muy difícil conocer el grado de idoneidad de la materia prima empleada.

Ello conlleva a un incremento del precio, equiparable a la de especies magras cotizadas como la merluza europea (*Merluccius merluccius*), y el consumidor occidental de la península ibérica limita su uso prácticamente al consumo en fresco (Cardoso y col., 2013), al igual que con otras especies, donde las poblaciones humanas costeras priman el pescado salvaje frente al cultivado y transformado en general.

Si bien, el consumidor general considera la calidad de las conservas de sardina pobre o mediocre, como resultado de una baja aceptabilidad general, ya que en muchos casos los cambios estructurales, químicos y sensoriales del músculo se ven alterados por

el proceso térmico, y la calidad de la materia prima utilizada no es la mejor, factor que la Industria suele aprovechar para camuflar estos defectos de idoneidad. Pero a pesar de ello, los productos de sardina en conserva son todavía un alimento de elevada demanda (Mercasa, 2012; Mercasa, 2016), especialmente como recuerdo de un producto de consumo popular de épocas recientes (resultado de conflictos sociales, guerra civil), pero cuya riqueza nutricional ya fue avalada por el prestigioso científico Henry Cheftel en 1953.

Esta idoneidad será reflejo de los cambios bioquímicos y microbianos en el tejido muscular del animal, posteriores a la captura, que dependen de manera muy significativa de los factores que efectúan la concentración de sustratos y metabolitos en los tejidos de los peces vivos, la actividad de las enzimas endógenas, la contaminación microbiana y las condiciones de almacenamiento y/o manipulación después de la captura (Sikorski y col., 1990). Los cambios *post mortem* en especies de peces pelágicos, como la sardina, se ven muy afectados por las prácticas de manipulación posterior a la captura (Frederiksen, 2002) y especialmente a procesos tecnológicos posteriores como congelación o elaboración de *surimi* o patés (Ahlstrom, 1960; Sonu, 1986; Watabe y col., 1989; Gómez-Guillén y col., 1996; Gökodlu y col., 1998; Kilinc y col., 2008).

La frescura y la funcionalidad tecnológica del músculo de pescado se pierde rápidamente si el incremento de temperatura y su prolongación en el tiempo es importante (Vázquez-Ortiz y col., 1997; Pacheco-Aguilar y col., 1998). La manipulación postcaptura inadecuada incrementa tanto la actividad enzimática microbiana y endógena (Nuin y col., 2006), así como la autólisis muscular que conduce a la degradación de proteínas y a la pérdida de su funcionalidad (Lugo-Sánchez y col., 1996). Para las especies de pescado azul, la proteína muscular es fácilmente desnaturalizada y los lípidos fácilmente oxidados (Robles-Burgueño, 1993); ambos fenómenos reducen la viabilidad de utilizar esta especie para su comercialización, sea en fresco, en conserva o para desarrollo de nuevos productos. La literatura científica resalta que el olor a deterioro en el pescado (a 0°C), se manifiesta después de 17 días (Ehira y Uchiyama, 1986), el cual puede ser retirado en sardina envasada a

vacío aplicando clinoptilolita, una ceolita natural (Kuley y col., 2012), si bien, y como se indicará más adelante, este límite de tiempo en la aparición de este olor característico depende de varios factores.

1.2. LA CONSERVACIÓN DEL PESCADO

El pescado tras su captura o muerte se descompone rápidamente por lo que es imprescindible salvaguardar en lo máximo posible las cualidades intrínsecas de este tipo de alimento, tanto desde un punto de vista nutricional como comercial y sanitario. La descomposición del pescado es mucho más rápida a igual temperatura que cualquier otro tipo de producto cárnico, pues al fin y al cabo, la parte comestible (por lo general) del pescado no es más que músculo, si bien posee una serie de características morfológicas o estructurales, de composición y tipo de constituyentes, que lo hacen susceptible de una degradación acusada (Botta, 1995). Así, su deterioro es causa de la actividad enzimática y a la actividad microbiana, principalmente. Sin duda alguna, el tipo de muerte (en función del arte de pesca) y la posterior manipulación y conservación a bordo son factores extrínsecos importantes a considerar (Aubourg, 2016).

Las especies pelágicas como el jurel y la sardina tienen unas escamas que se desprenden fácilmente y una piel muy fina, por lo que una mala manipulación de este pescado romperá estas barreras naturales frente a la invasión microbiana superficial. Otras especies, como el rodaballo, tienen una piel mucho más resistente y gruesa, lo cual facilita en cierto grado su periodo de conservación (Nuin y col., 2006).

Los peces son animales poiquiloterms y concretamente los peces pelágicos que se localizan frente a nuestras costas pueden tener una temperatura corporal baja, en torno a 12-14°C en épocas más frías (Beschta y col., 1987). Así, a pesar de refrigerar el pescado tras su muerte, sus propias enzimas se encuentran a una temperatura adecuada para continuar con su actividad aunque más lentamente (Haard, 2002). Además, al igual que otros vertebrados, con la muerte del pescado tienen lugar una serie de cambios fisiológicos que activan otras enzimas que permanecían inactivas en vida, como las catepsinas (Jiang y col., 1996; Pazos y col., 2015).

Acorde con esta temperatura, en el mar frente a las costas gallegas existen un grupo de bacterias autóctonas denominadas psicrófilas, ya que su rango óptimo de temperatura para su desarrollo oscila entre +4 y +15°C, si bien, pueden desarrollarse lentamente a temperaturas más bajas (-1 a 0°C), bacterias inherentes al pescado y distribuidos por toda su superficie corporal, branquias y vísceras (Gram y Dalgaard, 2002). La flora microbiana de la piel y branquias ve obstaculizada su penetración en el cuerpo del pescado en vida debido a una capa protectora de mucus. Tras la muerte del pez, este mucus se descompone y la invasión microbiana del pescado está asegurada (Bjomsdottir y col., 2009). Dependiendo de la especie de pez del que hablemos, la piel será tras el mucus otra barrera que las bacterias deberán sortear para invadir el músculo y descomponerlo.

Son pues las enzimas y las bacterias los factores fundamentales que han de tenerse en cuenta para prolongar la conservación del pescado, minimizando o destruyendo su actividad (Ababouch, 2002). El Hombre, sabía de la inestabilidad del pescado en la conservación frente a otro tipo de carnes aunque no cómo, con lo que recurrió a sistemas que permitiesen un mayor periodo de almacenamiento del mismo para garantizar un buen comercio. Observó que con temperaturas ambiente más altas, como colgar el pescado cerca de fogatas, éste se secaba y no se descomponía tan rápido, aumentando su conservación (Arvanitoyannis y Kotsanopoulos, 2012). Este fue el inicio de métodos de conservación que aplicaban temperaturas altas, a mayores de otras técnicas químicas incipientes como el ahumado. Aunque de origen remoto, el uso de la sal común (NaCl) también prolongaba el periodo de conservación del pescado sin recurrir a otros tratamientos físicos, hábito que potenciaron los romanos en la Península Ibérica hasta nuestros días (anchoas, mojama), si bien este conocimiento se aplicó profusamente más tarde con el descubrimiento del Bacalao (*Gadus morhua*) de Terranova, el cual era preciso preservar debido a los largos días de transporte hasta tierras europeas (Romaní, 1997; López-Capont, 2001; Menard, 2006).

Pero éstos y otros métodos que fueron apareciendo más tarde, y hasta nuestros días, modificaban sustancialmente las cualidades sensoriales intrínsecas del pescado natural, es decir, tal cual se

obtienen del mar. Lo que sí debió ser fundamental fue la observación de que con menor temperatura ambiente el pescado duraba más. Pero no fue hasta el siglo XVIII cuando la aplicación del frío a nivel semiindustrial se hizo eco. Fue en Hull (Reino Unido), donde los pescadores traían en sus bodegas pequeños bloques de hielo (icebergs) de la zona del Mar del Norte, que almacenaban en silos especiales para su acondicionamiento. El hielo se picaba y añadía al pescado procediendo así a su distribución. Hoy en día, el hielo se obtiene más rápido por diferentes métodos y en mejores condiciones higiénico-sanitarias, si bien su modo de aplicación apenas ha variado desde entonces. La aplicación de cámaras refrigeradas enfría también el pescado, si bien existen ciertos inconvenientes (secado superficial del pescado) que hacen que su empleo se conjugue con el hielo (Burguess y col., 1971; Pilcher, 2017)

1.2.1. El pescado fresco

Mantener las condiciones nutricionales y sensoriales inherentes de un pescado fresco inalterables sólo sería posible empleando la ultracongelación (Farouk y col., 2004), pero esta tecnología es cara para ciertos sectores socioeconómicos de la población, concretamente el sector extractivo artesanal o de bajura como ocurre en Galicia, un sector familiar o semiindustrial que no ha variado su forma de trabajar y tratar el pescado desde hace siglos. Sólo durante estos últimos 50 años, nuevas tecnologías de detección de pescado (sonar), empleo de materiales más resistentes (polímeros plásticos para redes), nuevas máquinas de recogida (haladores), etc., facilitan su trabajo de pesca pero el trato y la conservación de las capturas sigue siendo idéntico al siglo pasado.

1.2.1.1 Sistema de conservación tradicional.

Para preservar las características intrínsecas del pescado, en Galicia la flota de Bajura y Altura emplea el hielo en escamas (a base de agua dulce, a veces con un pequeño porcentaje de agua de mar), si bien existen una serie de factores positivos y negativos a cada flota en relación al empleo del hielo como medio refrigerante. El empleo del

hielo posee una serie de ventajas en los barcos de pesca litorales (Pascual y Rodríguez, 2000; Frederiksen, 2002):

- Se ahorra el costo de una instalación con refrigeración mecánica. Estos barcos pequeños suelen tener un mal aislamiento del casco, aún cuando posean bodega, por lo que de poseer refrigeración mecánica habría que sumar un mayor costo de combustible para mantener la cámara en condiciones óptimas.
- Dado que las capturas son poco abundantes, el espacio reservado para el hielo requerido es mínimo, eso sí, debe estar en una zona aislada de puntos contaminantes y de fácil acceso, y protegido con estructuras isotermas.
- El hielo ofrece un rápido enfriamiento del pescado al tiempo que “limpia” la superficie de limo y bacterias por el arrastre del agua de fusión, pero recontamina el de capas inferiores.
- Ya que la temperatura del hielo es fija, existe un control relativo de la temperatura del pescado.

El éxito del empleo del hielo como medio de enfriado radica en la cantidad, el tamaño, la forma y la disposición espacial del hielo sobre el pescado. Los problemas más frecuentes relacionados con el hielo en la flota de pesca son:

- enfriamiento lento, pues se usan hielos de tamaño grueso (“hielo viejo”) y por tanto la superficie de contacto pescado-hielo es insuficiente, o bien, por el uso de láminas o films plásticos de separación hielo-pescado que impiden una eficaz función del hielo,
- trozos finos de hielo hacen que el agua de fusión drene mal y el pescado se halle inmerso en un medio acuoso contaminado (bacterias),
- el uso de hielo picado crea, tras fundir, bóvedas o huecos, refrigerando mal el pescado y favoreciendo oxidaciones.

El hielo debe derretirse estableciendo un contacto efectivo con el pescado; el uso de hielo en escamas favorece este hecho, pues al derretirse la capa en íntimo contacto con el pescado, las capas superiores se deslizan hacia el fondo manteniendo cubierto el pescado. Desde un punto de vista técnico, la refrigeración con hielo es más eficaz si el pescado se halla rodeado en su totalidad por hielo, pero es demasiado costoso y voluminoso para llevar a cabo, y tendría cierta razón en especies de alto valor económico y resistentes (salmón, rodaballo, por ejemplo). Otro de los inconvenientes que se presentaría, si el pescado permanece en hielo algunos días, es lo que se conoce por “quemado” que no es más que una pérdida de la aceptabilidad de la piel al presentar peor aspecto como consecuencia del contacto directo del hielo a las superficie de contacto a la que se “pega”; si son más días de almacenamiento como ocurre en Gran Sol, los peces blancos eviscerados presentan en su zona abdominal tonos amarillentos como resultado de fenómenos oxidativos.

Como alternativa al hielo tradicional en escamas, se han propuesto varios sistemas de subenfriado o *superchilling* (Johansen y col., 1996; Nordtvedt y col., 1996; Erickson y col., 2011), que consiste en rebajar la temperatura por debajo de los 0°C, pero sin congelar el pescado, retardando la instauración del rigor mortis. En países del Norte de Europa, desde los años 70, barcos pelágicos dedicados a la captura de arenque y caballa emplean dos técnicas de refrigeración que combinan el frío y el agua del mar (Ulrich y col., 2002). Cuando el agua de mar está a la temperatura adecuada, se sumerge la captura para su almacenamiento. Opcionalmente en ambos casos, el pescado se puede mantener en esta agua de mar o bien eliminar el medio refrigerante y almacenar el pescado en cajas con hielo o en cámara refrigerada. La temperatura de trabajo no llega a bajar de los -3°C. Entre estas opciones tenemos el uso de (Rodríguez, 2000a):

- a) Agua de Mar Enfriada, AME (CSW, del inglés *Cool Sea Water*, Imagen 2), que consiste en aplicar una proporción adecuada de hielo en escamas en agua de mar, que con un sistema de recirculación, homogeneizará la temperatura en un periodo breve de tiempo, y alcanzada

la temperatura deseada se introduce el pescado, proporcionalmente a la capacidad del tanque (media de 60% pescado: 40% agua de mar). No se está aplicando en la costa gallega.

- b) Agua de Mar Refrigerada, AMR (RSW, del inglés *Refrigerated Sea Water*), similar al anterior, pero en vez de enfriar el agua de mar del depósito con hielo, se realiza por intercambio térmico a través de serpentines internos, donde circula un gas refrigerante. No se está aplicando en la costa gallega.
- c) Hielo líquido, que consiste en generar mecánicamente microcristales de hielo fluidos en una masa de agua ligeramente salada, que se deposita sobre el pescado encajonado, cubriéndolo totalmente depositándose una masa de microcristales de hielo adyacente al pescado, escurriendo el líquido sobrante hacia un sistema de recirculación (Losada y col., 2004). Su principal desventaja es el coste del equipamiento, y la calidad del producto depende de las especies a tratar, como el daño presentado en ojos (turbios, por lo que se conoce como quemado por hielo), especialmente en ejemplares de gran tamaño (Piñeiro y col., 2004), pero a pesar de ello, la temperatura de enfriado del pescado con este sistema baja más rápido (más rápido que en los 2 anteriores), prolongando la vida útil del pescado y dañando menos la piel, como se ha comprobado en diferentes especies atlánticas de cultivo y salvajes como merluza *Merluccius merluccius* (Rodríguez y col., 2004), sardina *Sardina pilchardus* (Losada y col., 2004), jurel *Trachurus trachurus* (Rodríguez y col., 2005), rodaballo *Psetta máxima* (Rodríguez y col., 2006), lubina *Dicentrarchus labrax* (Cakli y col., 2006) o salmon *Salmo salar* (Erickson y col., 2011). Esta modalidad suele utilizarse en algunas de las lonjas gallegas, tras la descarga de los barcos, pero es un sistema costoso para una embarcación de litoral, y que precisa de un espacio del buque

importante, donde los actuales diseños están aprovechados al máximo e imposibilitan su incorporación.

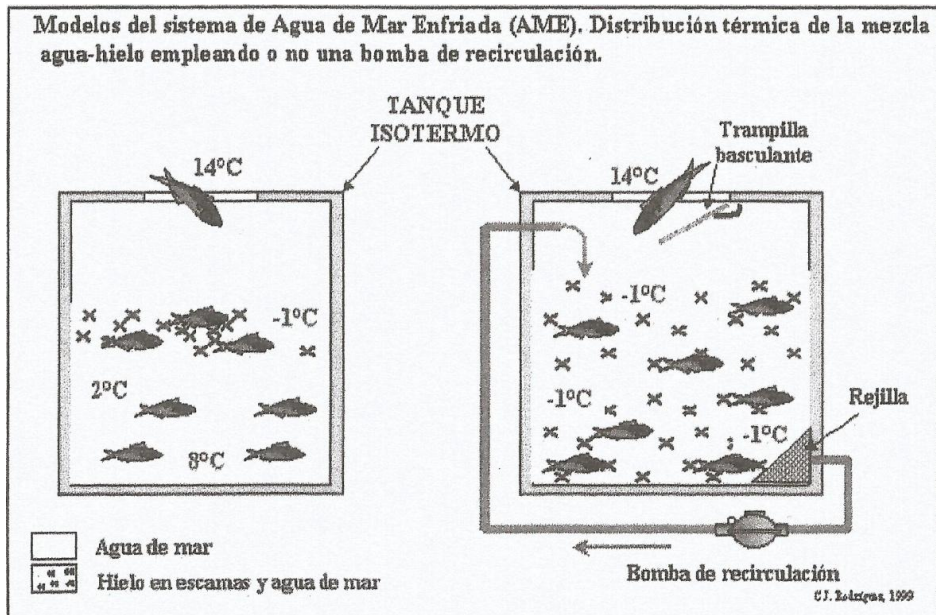


Imagen 2. Sistema AME (CSW) para refrigerar pescado tras captura. Fuente: Rodríguez, 2000a.

La idea general es mantener el pescado fresco (no congelado) y retrasar la instauración del rigor mortis, ralentizar la actividad autolítica y bacteriana. A cualquiera de estos sistemas de enfriado, se podrían añadir sistemas alternativos de conservación como aditivos, que en el caso de España está prohibido dicha práctica, a excepción del ácido ascórbico, ácido cítrico y sus sales, si bien, hay experiencias realizadas con ozono (O_3), pero desaconsejan su uso ya que aunque son eficaces en reducir la flora bacteriana del pescado, posee un efecto prooxidante sobre las grasa del pescado (Losada y col., 2004), como se observó en *Sardina pilchardus*, con valores de 1, 1.6 y 3.1 mg TBARS/kg (TBARS: sustancias que reaccionan con el ácido 2-

tiobarbitúrico) al final del periodo de vida útil (5 días hielo tradicional, frente a 12 días del hielo líquido y 15 con ozono, respectivamente), pero a pesar de ello, el hielo líquido ha mostrado ser eficaz durante la conservación del pescado, con un ligero incremento en la tasa de sal (0,7%) tras 22 días de almacenamiento. Se han observado diferencias significativas también a nivel de Valor K (un parámetro de control de frescura), a partir del 5º día (20%) entre hielo tradicional y los de hielo líquido (alcanzan ambos en torno 40% en el límite de aptitud, y sin diferencias entre ellos hasta el final del estudio).

La forma de muerte es también fundamental a la hora de retardar la instauración del *rigor mortis* como Digre y col. (2011) demostraron con bacalao, especialmente destacable en cuanto a la degradación del ATP. Con un sacrificado normal (que provoca estrés en el animal) y el tratamiento de refrigeración tradicional durante una semana, la HxR es el derivado del ATP predominante, mientras que con ejemplares anestesiados y/o inmersos directamente en hielo líquido durante su conservación, al cabo de 7 días el IMP es el nucleótido mayoritario seguido de cerca por la HxR; a día 14, el lote tratado tradicionalmente posee cantidades similares de Hx e HxR, con nulo IMP, mientras que los ejemplares anestesiados y tratados con hielo líquido o inmersos directamente en hielo líquido (que provoca una paralización inmediata por shock térmico) mantienen tasas similares de IMP e HxR, con niveles de Hx ligeramente superiores a los detectados 7 días antes. Por tanto, el estrés aumenta la degradación del ATP, o el valor K, que de 75% a día 7 (pescado aceptable) pasa a un 90% al cabo de 14 días en el pescado tratado tradicionalmente (rechazable), mientras que con pescado anestesiado de 40 pasa a 45%, y el sumergido directamente en hielo líquido de 35% a 50% en 7 y 14 días, respectivamente, en ambos días y casos, el pescado es aceptable. Hattula y col. (1993), proponen para *Coregonus wartmanni* de buena calidad un valor K hasta 80% (o 1,0 $\mu\text{mol/g}$ de IMP), con una vida útil de 5-7 días.

A pesar de que la velocidad de enfriamiento del hielo líquido es más eficaz en bajar de los 0°C (22-30 min) que el hielo en escamas (precisa horas para mantenerse ligeramente por encima de los 0,2°C), que reduce daños físicos por presión, así como la prolongación de la vida útil (14 días, con valores microbiológicos inferiores a los

legales), las cualidades sensoriales externas del ojo y agallas minimizan su valor comercial frente al sistema de hielo tradicional (7 días de vida útil), por lo que para garantizar materia prima adecuada a la Industria o al mercado fresco minorista, no compensa la implantación de este avance tecnológico de refrigeración en continuo si el pescado va a ser comercializado en un periodo inferior a una semana.

En el caso concreto de *Sardina pilchardus* (Schubring and Meyer, 2006), el uso de hielo líquido a bordo y durante el posterior almacenamiento no muestra diferencias significativas a nivel sensorial, microbiológico ni químico (BVT y TMA) con el hielo tradicional.

Pero la distribución en tierra del pescado fresco con hielo también presenta ciertos inconvenientes físicos que afectan tanto a nivel técnico como comercial:

- supone en primer lugar un peso “muerto” y molesto la presencia del hielo;
- la presentación del pescado al público o comprador queda camuflada por este hielo;
- el agua de deshielo causante de accidentes y de suciedad;
- en la venta al detalle, el pescado queda expuesto a temperaturas elevadas y corrientes de aire lo cual incrementa su deterioro;
- muchas especies de pescado, sobre todo las capturadas en grandes volúmenes y/o de talla pequeña como las pelágicas cuya evisceración es inviable en barco o en lonja, presentan vísceras que incrementan el peligro de deterioro del músculo;
- desde la captura del pescado hasta su compra por el consumidor, el pescado se ve envuelto en toda una serie de manipulaciones por parte de todos los sectores de comercialización intermedios lo cual agrava la durabilidad del producto.

Por todo ello se han buscado otros sistemas alternativos de conservación que salvaguarden las características intrínsecas del pescado durante el tiempo lo mejor posible.

1.2.1.2 Conservación en atmósferas protectoras (MAP).

Para evitar el uso del hielo, se ha desarrollado una técnica, química y física al mismo tiempo, sin alterar aparentemente las cualidades intrínsecas del pescado fresco, que lo que hace es mezclar una serie de gases (CO_2 , N_2 y O_2 , fundamentalmente) en un recipiente estanco con el pescado a fin de evitar oxidaciones de la grasa del mismo e inhibir o ralentizar el desarrollo microbiano. Su uso debe realizarse con ciertas restricciones. Esta técnica se conoce por envasado en Atmósfera Protectora o Modificada (Stammen y col., 1990). Otra variante, es aplicar una Atmósfera Controlada, ya que el empleo de una atmósfera protectora tras el envasado varía su composición gaseosa inicial con el tiempo, mientras que la atmósfera controlada, mantenemos el nivel inicial a voluntad o variamos intencionadamente la mezcla gaseosa en el tiempo sin abrir la cámara donde tengamos almacenado el pescado. Esta técnica ha de combinarse con frío, pues la actividad enzimática y ciertas bacterias permanecen activas en estas condiciones. Ciertos trabajos combinan ciertos productos químicos para incrementar el periodo de conservación, tales como ácidos ascórbico, láctico, cítrico, sórbico y sus sales, pero con el inconveniente de que afectan a sus cualidades sensoriales (Mejholm y Dalgaard, 2002; Mejholm y Dalgaard, 2007; Cortesi y col., 2009; Sinhg y col., 2016; Hassoum y Coban, 2017).

En cualquier caso, el pescado al menos debe de ser eviscerado, lavándolo cuidadosamente y aplicando la temperatura lo más baja posible antes de su envasado en Atmósfera Protectora o Controlada. Los materiales a usar en el caso del envasado en Atmósfera Protectora han de ser, en principio, inertes e impermeables a los gases o con una permeabilidad al oxígeno muy baja (Davies, 2001). El producto ha de ser visible para que no genere desconfianza en el comprador. Existen toda una serie de polímeros plásticos cuya mezcla adecuada nos facilita este fin.

Por desgracia la flota de bajura gallega carece de infraestructuras y el soporte económico para el desarrollo de este tipo de tecnología, lo cual sólo logran empresas transformadoras intermediarias lo cual encarece el coste del producto por el proceso previo de manipulación que el pescado sufre hasta su adquisición por el pescador. Pero el envasado y exposición del pescado en Atmósfera Protectora o Modificada posee otra serie de ventajas:

- No se manipula el pescado durante su distribución y exposición tras su primer envasado
- Mejora la presentación del producto
- Facilita su posterior preparación culinaria al consumidor
- Se evitan la incorporación o liberación de olores por parte del pescado
- Es un sistema más higiénico
- Se controlan ciertas bacterias patógenas susceptibles de contaminar el pescado por diferentes vías.

Sin embargo, el envasado en Atmósfera Protectora o Modificada para pescado es una tecnología que no se observa como dominante en los lineales de los mercados de España, salvo contadas excepciones como por ejemplo en productos congelados y seco-salados, pero muy raro para pescado fresco. La bibliografía científica al respecto es por el contrario muy abundante y de aplicación directa en países con Islandia o Dinamarca.

Desde hace un par de décadas, aproximadamente, y a partir de estudios en productos cárnicos, se aplica la tecnología del envasado en atmósferas protectoras o modificadas (MAP) al pescado, aumentando su vida útil, según especie, de 6 a 10 días, manteniendo temperaturas de refrigeración, lo que elimina la utilización del hielo. Este aumento en su vida útil viene implicado por dos hechos:

- a) la utilización de temperaturas bajas que retardan el crecimiento bacteriano y la actividad enzimática,
- b) por la ausencia de oxígeno o aire, que se sustituye por vacío o aplicación de otros gases (CO₂, N₂), vital para la

mayor parte de las bacterias putrefactivas del pescado, además de prevenir la oxidación lipídica. El CO₂ además inhibe, al menos inicialmente, el crecimiento de hongos y bacterias. Pero la ausencia de O₂ y la ruptura de la cadena de frío pueden provocar la aparición de *Clostridium botulinum* (especialmente el tipo E, típico de productos del mar) con el consiguiente riesgo sanitario, por lo que algunos autores recomiendan usar cierta tasa de O₂, que realza por otro lado el color rojo o rosado de ciertas especies de pescado, pero con el inconveniente de promover fenómenos de oxidación lipídica (Giménez y col., 2002).

Ahora bien, la formulación sobre qué atmósfera protectora a aplicar es variable según la bibliografía consultada, con varias alternativas para una misma especie, por lo que no se puede estandarizar, siendo preciso estudiar y especificar dicha composición por la propia Industria en base al producto que se vaya a obtener de cada especie, y lo más importante, el tipo de consumidor al que se dirige.

1.2.1.3 Sistemas de conservación emergentes.

Hoy en día hay una serie de nuevas tecnologías que se pueden combinar entre ellas y conjugar con el uso del frío para incrementar el periodo de vida útil o conservación de los alimentos en general. Estas tecnologías son:

- *Irradiación*: o por decirlo de otra forma, pescados ionizados, este último nombre parece más inocente, ya que el primero nos recuerda a fugas o contaminaciones radioactivas y siempre infunde temor en el consumidor, y volvemos a lo de siempre: falta una información y educación del consumidor, y que debería comenzar como una asignatura obligatoria en la enseñanza primaria y secundaria. Los alimentos envasados (para evitar posteriores recontaminaciones) se exponen a una fuente

de radiación (gamma, X o electrones) en un corto tiempo, para después almacenarlos como se viene realizando habitualmente (refrigeración). Esta técnica, cuya aplicación debe ser indicada en el etiquetado para informar al consumidor, está poco generalizada en el pescado fresco, pese a sus ventajas (: reducción de bacterias alterantes, sobre todo de las patógenas; reducción de parásitos, aumentando el periodo de comercialización) ya que las grasas, que las del pescado son muy inestables, se enrancian rápidamente, destruyéndose también algunas de las vitaminas liposolubles o ciertos aminoácidos. Sin embargo, son necesarios estudios en este sentido controlando el tipo y las dosis de radiación, y tipo de pescado. Hasta el momento, ¿qué compensa más la pérdida de ciertos nutrientes o la reducción de riesgos sanitarios? (Jeevanandam y col., 2001; Chouliara y col., 2005; Tomac y Yeannes, 2015; Aflaki y col., 2015a; Aflaki y col., 2015b; Eldaly y col., 2016; Kakatkar y col., 2017).

- *Pulsos lumínicos*: se generan radiaciones dentro del espectro UV/visible a una alta intensidad durante corto tiempo; han sido empleados en gambas con óptimos resultados. Es una tecnología útil para productos pequeños ya que actúa a nivel superficial (Abida y col., 2014; Ferrario y col., 2015; Wang y col., 2016). Es un campo poco estudiado en el pescado, y alimentos sólidos y de gran volumen en general (Tomasevic y Rajkovic, 2015).
- *Campos eléctricos pulsados de alta intensidad*: las membranas celulares poseen un umbral crítico en su potencial eléctrico que cuando se rebasa, y de forma irreversible, por una aplicación de un campo eléctrico externo con un grado de intensidad elevado, con lo que se forman orificios en la membrana alterando por tanto su permeabilidad. En este modelo se basa la aplicación de esta tecnología, destruyendo bacterias (y algunas

enzimas), pero para una inactivación eficaz, esta tecnología depende de la temperatura, pH, fuerza iónica del alimento, duración del campo eléctrico, del tipo de alimento y de la especie de bacteria. Esta tecnología se aplica actualmente a alimentos líquidos; de momento, su uso en alimentos sólidos presenta ciertos problemas (Barbosa y col., 1999).

- *Campos magnéticos oscilatorios*: esta tecnología se emplea para modificar la migración y la alteración del crecimiento y reproducción de las bacterias, modificando el flujo iónico a través de las membranas o cambiando la orientación de moléculas y membranas. Sin embargo, para su aplicación es importante que el alimento posea cierta resistividad elevada. En este tipo de tecnología se basa el empleo del microondas (Barbosa y col., 1999).
- *Alta presión hidrostática (HPP)*: técnica aplicada inicialmente a cerámica y superaleaciones, ha sido en esta última década donde se expandió a su empleo por la industria alimentaria. En una cámara de refuerzo especial, y usando agua como medio de aplicación, el alimento se somete a una elevada presión isostática destruyendo enzimas y microorganismos, sin alterar cualidades intrínsecas como el aroma. De momento la técnica presenta aún algunos inconvenientes. Así, pruebas realizadas con pescado, éste presenta un músculo opaco, con pérdida de color y brillo original, y una textura ligeramente blanda. Sin embargo, es posible disminuir en cierto grado la presión combinándose con la refrigeración, con lo cual siempre ganaremos en vida útil. De hecho, en EEUU este sistema se está empleando comercialmente para moluscos y crustáceos y así facilitar la extracción de la porción comestible (Campus y col., 2010; Manuel y col., 2011; Gonçalves y de Paiva, 2013; Ronholm y col., 2016).

Sin duda alguna, el sistema más investigado en esta última década es el uso de HPP, enfocado a una destrucción bacteriana para prolongar la vida útil. Esta actividad antibacteriana ha sido más que demostrada en productos de la pesca, observando que dicha eficacia es patente a partir de 350 MPa 6 min, contra *Vibrio parahaemolyticus* en moluscos *Mercenaria mercenaria*, reduciendo hasta 5 escalas logarítmicas (Sevenier y col., 2012), duplicando la vida útil hasta el doble como en la oreja de mar *Haliotis rufescens* a 500 MPa 3 min (Silva y Gibbs, 2010). Incluso logra matar al parásito nematodo *Anisakis* en varias especies salvajes con condiciones bajas de tratamiento (207 MPa 3 min) en salmón rey y caballa (Durance, 1997; Mafart y col., 2002). La histamina, una amina biógena producto de la actividad bacteriana y de repercusión en la salud humana, sigue generándose hasta 200 MPa lo cual indica que no afecta a determinadas especies bacterianas, pero puede reducir la actividad formadora de histamina de *Morganella morganii* hasta un 23% cuando se aplican hasta 400 MPa, o del 46% a 100 MPa y 85% con 400 MPa para *Photobacterium phosphoreum*. Inoculadas estas especies en caballa, la formación de histamina para *M. morganii* se inhibe entre 200-300 MPa y para *P. phosphoreum* con 100 MPa (Thuault y col., 1991).

Pero hasta ahora, los efectos sensoriales a nivel textura (blanda) y color (pérdida de tono rojizo) son evidentes. Y este efecto negativo se repite en los ensayos posteriores que vienen desarrollando diferentes científicos. Si bien, se avala su eficacia antibacteriana, lo cual provoca un aumento de vida útil (observado a través de parámetros como BVT, pH o TMA), pero afecta a las proteínas sarcoplasmáticas y por ende a su textura como firmeza y jugosidad (Cammack y col., 1999), o fomentando un incremento en los evaluadores de la oxidación grasa como el índice de TBA (Lund y col., 1987), por lo que se sugiere el uso de tratamientos bajos ,135 MPa, pero con una capacidad antibacteriana leve y así mantener por unos días esas cualidades sensoriales (Lund y col., 1985).

1.2.1.4 Sistema de conservación química.

Otro método de conservación en pescado fresco para incrementar su vida útil es el uso de productos químicos (aditivos). Por reglamentación higiénico-sanitaria de la UE, en pescado fresco sólo se admiten los ácidos ascórbico, cítrico, y las sales de éstos. Sin embargo, los extractos naturales (aceites esenciales, ácidos orgánicos, ..) están siendo aplicados en estos últimos años. Las últimas investigaciones apuntan a que otras sustancias puedan jugar un papel importante frente al control de diversas bacterias, en este caso, la generación de determinados productos de la metabolización de bacterias como el ácido láctico, entre otros. Este ácido es formado incluso por el pescado justo tras su muerte durante el metabolismo de glucólisis anaerobia, pero en bajas concentraciones pues la tasa de glucógeno del pescado suele ser inferior al 1%, de ahí que el pH mínimo del músculo suela estar comprendido entre 5,5 y 6,0 según especie (Hall, 2001), insuficiente para actuar negativamente frente al desarrollo de determinadas bacterias patógenas o indeseables, las cuales generan aminas que incrementan paulatinamente el pH del músculo (Stamatis y Arkoudelos, 2007; Günlu y Koyun, 2013, Genç y col., 2013). De las bacterias acidolácticas, también deriva la nisina, un polipéptido con poder bactericida, se aplica en productos de la pesca como salchichas, donde las modificaciones sensoriales no son tan acusadas, incrementando 5 veces su vida útil con 25-50 ppm (Raju y col., 2003), o pescado ahumado envasado al vacío destacando su efectividad frente a *Listeria monocytogenes*, pero sin aportar datos sobre las cualidades sensoriales, simplemente un mero examen de olor y visual que se valora como aceptable (Eszabo y Cahill, 1999). El uso de nisina combinado con ácido láctico (2%) refuerza la eliminación de determinados grupos bacterianos del deterioro en langostino como *Pseudomonas* y bacterias formadoras de SH_2 (Shirazinejad y col., 2010) o *Listeria monocytogenes* (Montville y col., 1995), mientras que Fall y col. (2012) indican que las biocinas en sí generadas por inóculos de *Lactococcus piscium* no intervienen en la inhibición de bacterias alterantes del pescado (*Brochothrix thermosphacta*) en langostinos pelado-cocidos, siendo más un efecto de competitividad entre especies, por la adquisición de los aminoácidos libres y

generando ácido láctico, no produciendo sensaciones que induzcan al rechazo por el consumidor (Ghanbari y col., 2013a).

Li y col. (2012) evalúan el efecto de una mezcla de vinagre y jugo de limón tamponado (2 y 2,5%) con el fin de reducir la tasa de sal común y controlar el desarrollo de *Clostridium prefringens* (inóculo inicial de esporas 2-3 log ufc/g) en *rostif* con diferentes tiempos de enfriado. Observan que en condiciones extremas de enfriado, *C. prefringens* inhibe su desarrollo con 2% de NaCl, mientras que la mezcla vinagre-limón fue efectiva en todas las condiciones ensayadas.

Ghanbari y Jami (2013b) revelan que mezclas de sales del ácido acético, sórbico y láctico (0,5; 0,25 y 2,5%, respectivamente) minimizan la flora bacteriana, principalmente flora Gram negativa, aumentando la vida útil del pescado refrigerado, y en base al pH resultante, se logrará controlar el desarrollo de *C. botulinum* y *C. prefringens*. Otros autores aplican mezclas de estos ácidos en el hielo en escamas que mantendrá el pescado refrigerado a bordo, observando en general para aerobios y anaerobios una bajada considerable de la flora en torno a 10^2 ufc/g en merluza con 0,175/0,05% de ácido cítrico/láctico, respectivamente, sin afectar sensorialmente a los ejemplares (García-Soto y col., 2013). En las clásicas especies de Gran Sol capturadas por la flota española (Merluza, Juliana y Gallo), con un máximo de 800 mg/kg de hielo de una mezcla comercial de ácido ascórbico/cítrico/láctico también ha mostrado ser eficaz en alargar la vida útil del pescado, disminuyendo el pH y el desarrollo de la flora bacteriana (mesófilos aerobios, psicrotrófos y bacterias proteolíticas), sin afectar a las cualidades sensoriales, y que en el caso de ejemplares pequeños de merluza, su vida útil se establece en 12 días frente a los 8 días con hielo tradicional (Sanjuás-Rey y col., 2012). El acetato de sodio se ha aplicado a filetes de trucha a vacío, aumentando su vida útil hasta los 16 días de almacenamiento refrigerado, con una calidad sensorial buena, afectando significativamente a la flora psicrofílica, mientras que en condiciones estándar o sólo a vacío, alcanzan 7 y 13 días, respectivamente (Etemadi y col., 2013).

Por último se hallan los aceites esenciales, o principios activos de extractos de diversas plantas aromáticas típicas de cualquier cocina

regional (orégano, tomillo, etc.). En Europa, en la cocina y procesamiento de alimentos tradicional, es bien conocida las propiedades de determinadas plantas en la conservación de embutidos, por ejemplo, donde especias u hortalizas como ajo, cebolla, pimienta, romero, tomillo, orégano, ... prolongan la vida útil de este tipo de alimentos. Ello ha llevado a un estudio químico pormenorizado de algunos de éstos (Javasena y Jo, 2013), cuyos resultados científicos avalan ciertas propiedades asociadas, y que la UE ha admitido recientemente como es el caso del extracto de romero (E-392), aunque más bien por sus propiedades antioxidantes, y que tiene posibilidades de ser usado en pescado y los productos de la pesca (Reglamento (UE) n° 723/2013).

En filetes de trucha al vacío (+4°C), la adición de aceite esencial de orégano (0,4%) junto con secuestrador de O₂ reduce significativamente la flora bacteriana, especialmente bacterias ácido lácticas (LAB), *Pseudomonas* y *Enterobacteriaceae*, aumentando su vida útil en 17 días (4, 8 y 14 días, para control-aire, aceite esencial y secuestrador de O₂, respectivamente). El pH baja de 6,7 a 6,1 para luego ir aumentando en todos los lotes hasta 6,9 por la descomposición proteica. Sin embargo, en los límites de aceptación sensorial del producto, los parámetros clásicos de calidad presentan un amplio rango de valores en función del tratamiento, como valor de peróxido, TBA y BVT (Mexis y col., 2009).

Goulas y Kontominas (2007) usan de 0,4 a 0,8% de aceite esencial de orégano en dorada, observando que con mayor tasa, la flora bacteriana inicial se reduce, lo cual se refleja en un aumento de vida útil hasta 33 días (16 días para el control) y con una menor formación de parámetros químicos de alteración bacteriana (BVT, TMA) y de oxidación lipídica (TBA), aunque se reconoce un sabor distinto (no relacionado con “pescado”, se supone) pero agradable. Este punto es sin embargo de suma importancia. La efectividad bactericida de estos aceites esenciales o extractos vegetales de nada sirven si con su MIC en el alimento real modifica sustancialmente las cualidades sensoriales que el consumidor espera de un alimento determinado, esto es, el olor o reconocimiento de ciertas especias en el pescado fresco puede limitar su aceptación al parecerle un atributo de olor o sabor extraño, no propio del alimento que adquiere, que su

instinto o memoria sensorial pueda advertirle que NO ES NATURAL (Burt, 2004; Silva y col., 2013).

Sin embargo, en determinadas culturas, habituadas a una alimentación muy especiada o aliñada, ciertas sensaciones pueden resultar agradables aunque no sean adecuadas a la especie pesquera objetivo. Esa es al menos la impresión, tal y como manifiestan los diferentes paneles de cata para trucha en estudios del Este europeo-Oeste asiático, que valoran positivamente producto con 1% aceite esencial de tomillo (Chamanara y col., 2012), 0,2% de canela (Zakipou-Rahimabado y col., 2013) o 0,2% de orégano, rechazando sensorialmente pruebas con niveles mayores del aceite esencial (Frangos y col., 2010; Pyrgotou y col., 2010), si bien, en todos los casos su efectividad antibacteriana es patente, reduciendo la flora en general, correspondiendo con una generación baja de metabolitos de esta actividad bacteriana (TMA; BVT), mientras que en los lotes control, *Pseudomonas spp*, *Enterobacteriaceae*, *Shewanella putrefaciens*, y otras bacterias productoras de SH₂ incrementan sus niveles.

Pero son tecnologías que hasta la fecha no han sido aplicadas de forma comercial por su elevado coste, o por los escasos éxitos en pescado, o por no estar autorizados legalmente, y de haberse realizado en pescado fresco, los cambios sufridos por éste desaconsejan su uso, salvo en regiones donde el especiado moderado o intenso del mismo sea un hábito gastronómico habitual.

1.2.2. Los productos pesqueros transformados. Las conservas.

Existen un par de terminologías que llevan a la confusión del consumidor, sin diferenciar una de otra en muchos casos y que a continuación se aclaran. Estos términos son: producto pesquero preparado y producto pesquero transformado.

Desde un punto de vista legal (BOE, 1984), por **producto pesquero preparado** se identifica a los productos pesqueros que hayan sido sometidos a una modificación de su integridad anatómica tales como el eviscerado, descabezado, corte en rodajas, fileteado y picado. Esta terminología es fácilmente confusa ya que muchas veces se piensa en productos pesqueros presentados como platos preparados,

cuando a lo que se hace mención es a una alteración morfológica del pescado y por tanto de presentación en fresco o congelado. Por **producto pesquero transformado** se identifica a los productos pesqueros que hayan sido sometidos a un tratamiento químico o físico, tales como, el calentamiento, el ahumado, la salazón, la deshidratación, el escabechado, aplicado a los productos refrigerados o congelados, asociados o no a otros productos alimenticios, o a una combinación de estos procedimientos. Curiosamente, bajo este término no se englobaría a las conservas, cuando son sometidas a un tratamiento de calentamiento agresivo o drástico. El envasado en Atmósferas Protectoras es una técnica que encaja legalmente en el tratamiento de producto fresco, sin embargo, este pescado fresco se ve sometido a un tratamiento físico por un lado (al disminuir la presión interna del envase) y químico por otro (se añaden una serie de gases diferentes a la del medio ambiente).

Desde una sintaxis legal, la **Conserva de pescado** es el producto pesquero al que se le aplica el procedimiento consistente en envasar los citados productos en recipientes herméticamente cerrados y en someterlos a un tratamiento térmico suficiente para destruir o inactivar cualquier microorganismo que pudiera proliferar, sea cual sea la temperatura en que el producto esté destinado a ser almacenado. Normalmente hablamos de esterilización comercial o industrial: proceso que destruye o inactiva, aplicando temperaturas adecuadas de una vez, los microorganismos patógenos o alterantes de los alimentos (Ansari y Datta, 2003).

Otros tratamientos que modifican sustancialmente las cualidades intrínsecas del pescado, y de amplia difusión en nuestros mercados, es la aplicación del salado (anchoa, mojama, bacalao), los marinados o escabechados (vinagretas, boquerón), del ahumado (por lo general abundan pescados ahumados en frío dentro de nuestro mercado nacional: salmón, trucha, japuta, atún) y de la pasteurización (mejillones y otros bivalvos), cada tecnología con sus parámetros técnicos específicos y por consiguiente unas características sensoriales y químicas diferentes e inherentes a cada uno de los productos obtenidos.

Obligatoriamente, la materia prima que se emplee para la elaboración de un producto transformado debe (o debería) ser lo más fresca posible o con unas condiciones higiénico-sanitarias lo mejor posibles. En algunas de estas tecnologías de transformación como el caso de la conserva, pueden existir casos fraudulentos que empleen materias primas no adecuadas en fresco o en congelado pero como el pescado va a ser tratado a altas temperaturas con la consiguiente destrucción de los microorganismos patógenos o alterantes, el detectar la idoneidad y salubridad de la materia prima usada en el producto final es difícil.

No existen parámetros químicos regulados legalmente que indiquen la idoneidad de una conserva salvo por su población bacteriana (si existiese, indicaría una recontaminación o inadecuada esterilización, que nada tendría que ver con la materia prima original), su contenido en metales (tampoco serían adecuados para reflejar la salubridad de la materia prima inicial), sustancias procedentes del barniz del envase como BADGE (Cunha y col., 2012) y su contenido en histamina, realmente relacionado con la frescura. Para este último parámetro (químico), la ley establece para pescado fresco un contenido máximo de 100 ppm (UE, 2005; UE, 2013), pero en muchas especies de pescado pueden darse valores muy bajos de este compuesto y estar en un estado de frescura muy bajo o alterado, por lo que es de interés encontrar otra serie de métodos químicos o físicos fiables y reproducibles que reflejen el verdadero estado de frescura de pescado original para desarrollar un producto transformado. Este es actualmente uno de los principales problemas con que se encuentra tanto estamentos de seguridad alimentaria, como de consumidores a la hora de poder cualificar la idoneidad de las conservas de pescado.

Pero en este trabajo se centrará en la tecnología de transformación del pescado en la que Galicia es líder en Europa: la conserva de pescado. De los diferentes productos que se elaboran dentro de los mariscos destaca la conserva de Mejillón y de los peces el atún y la sardina (ANFACO, 2016).

1.2.2.1 Breve Historia de las conservas.

El primer proceso conocido de conservación de los alimentos aplicando el calor a un envase herméticamente cerrado, para impedir el deterioro del contenido por la acción posterior de los microorganismos, fue realizado por el confitero francés Nicolás Appert, en pleno apogeo de la Revolución Francesa (López-Capont, 2001).

A Napoleón le inquietaban los suministros de alimentos a la Marina y el Ejército; por ello en 1795, los responsables del Ministerio del Interior convocan un concurso dotado con 12.000 francos para premiar a quien fuese capaz de encontrar un método que permitiera almacenar los alimentos durante largo tiempo para evitar su deterioro. Más tarde, en 1803, el Consejo de Sanidad francés, en su carta dirigida al Prefecto Marítimo de Brest, reconocía la calidad de los comestibles preparados por el ciudadano Appert. En 1804, éste inauguraba en Massy la primera fábrica de conservas del mundo. Su producción consistía básicamente en alimentos vegetales envasados en botellas de cristal, que se sellaban con alambre y lacre.

Las mejoras a este proceso llegaron con rapidez debido a las ventajas que representaban estos productos. En 1810, Peter Durand patentaba en Inglaterra el sistema para envasar alimentos en recipientes de hojalata según el método Appert. Thomas A. Kenneth consiguió la primera patente en Estados Unidos en el año 1825. Pero fue el también confitero francés Joseph Colín, en 1823, quién creó un nuevo tipo de conserva: las sardinas en aceite de oliva (López-Capont, 2001).

Para explicar la llegada de las conservas a Galicia, existe una vieja tradición, por la cual, en la primera mitad del siglo XIX, debido a un hipotético naufragio de un buque francés frente a la Ría de Pontevedra, en las playas del litoral gallego se dispersaron botellas y latas conteniendo productos cocinados en su interior (Capel, 1985).

Hacia el año 1750, con la llegada a Galicia de los catalanes en su mayoría (Romaní, 1997), se implantan nuevas técnicas tanto de pesca (artes de arrastre como la xábega, bacas), así como innovaciones tecnológicas respecto a la salazón (maquinaria como la prensa y diferentes métodos de salazón, López-Capont, 1988). Ello da pie a la

creación en nuestra región de una floreciente industria de salado y posteriormente conservera basada en la sardina. Ya en 1840 existía en Noia un obrador artesano, propiedad de la familia Caamaño, que envasaban sardinas, pichones y perdices (Capel, 1985).

Desde los comienzos hasta la actualidad, la industria que aplica este principio ha evolucionado de tal manera, que las conservas alimenticias son productos de consumo común en la mayoría de los hogares de todo el mundo. En nuestro país, una de las comunidades autónomas con mayor número de empresas dedicadas a este sector es Galicia, donde el sector de conservas de pescado representan un alto porcentaje del total de empresas vinculadas a los productos del mar, siendo las de sardina la segunda en volumen de fabricación después de la de atún en cuanto a conservas de especies piscícolas se refiere (ANFACO, 2016).

El volumen de capturas realizado por nuestra flota pesquera, la cercanía de las fábricas a los puertos de desembarco, la larga tradición en la fabricación de estos productos introducida por los industriales catalanes a finales del siglo pasado y el gran número de población vinculada al mar y sus recursos, ha propiciado este desarrollo, introduciendo estos productos en mercados de todo el mundo.

1.2.2.2. La elaboración de conservas.

El principio aplicado durante el proceso de elaboración de conservas es simple: consiste en esterilizar el alimento, en este caso el pescado, aplicando una alta temperatura y presión a un envase estanco que contiene el alimento de manera que toda la flora bacteriana asociada a él sea destruida, evitando así el deterioro del producto. Con ello no sólo se consigue preservarlo durante largos periodos de tiempo, sino que también se le confiere unas cualidades sensoriales diferentes a la materia prima original (Bratt, 1995, Ababouch, 2002). En la Imagen 3 se esquematiza una línea general de producción de conservas.

El pescado se puede recibir fresco con hielo, si éste se procesa rápidamente el mismo día, sino se almacena en cámaras frigoríficas a temperaturas comprendidas entre 0-5°C, pudiendo aguantar así el pescado varios días (dependiendo de la especie, 2-3 días para sardina,

10 días para atún) a la espera de ser procesado. Si la materia prima no puede ser procesada en esos días, ésta suele congelarse, si no se ha recibido ya congelada.

En función del tipo de conserva que se realice, la materia prima puede recibirse también cocida (congelada o no), como ocurre en el caso del mejillón y el berberecho, y en pescado, últimamente algunas empresas gallegas utilizan atún cocido, limpio, envasado a vacío y congelado por empresas de terceros países.

En el caso de la sardina, ésta suele recibirse congelada y fresca con hielo. Si la sardina está congelada, en función de la temperatura ambiente, se descongela con un período de tiempo previo a la hora de iniciar el proceso industrial (12-15 horas para una temperatura ambiente de 15-17°C, por ejemplo, o bien, sumergiéndola en agua corriente); todo dependerá de la logística de cada empresa. Existen equipos continuos para descongelación por microondas, pero no se usan en este sector.

Es necesario conocer estos detalles para al menos optimizarlos y controlarlos, ya que las condiciones preproceso de conserva como son:

- el método de captura y tratamiento a bordo, con las consiguientes contaminaciones bacterianas debidas al manejo y roturas de la piel y cavidad abdominal de algunas piezas (López-Sabater y col., 1994; Gates, 2014),
- el tiempo de permanencia en la cámara fría (Rodríguez y col., 1991),

determinan la calidad organoléptica inicial de la materia prima (Garthwaite, 2001). Durante el almacenamiento de la materia prima, los fenómenos de autooxidación lipídica, enzimas autolíticos y la flora microbiana, continúan su actividad degradativa, aunque ralentizada por las bajas temperaturas (Huss, 1994), lo cuál influirá directamente en la calidad del producto terminado (Aubourg, 2001, Pons-Sánchez y col., 2005; Yerlikaya y col., 2005; Borgtrom, 2012). Una vez que comienza el proceso industrial, éste transcurre lo más rápidamente posible.

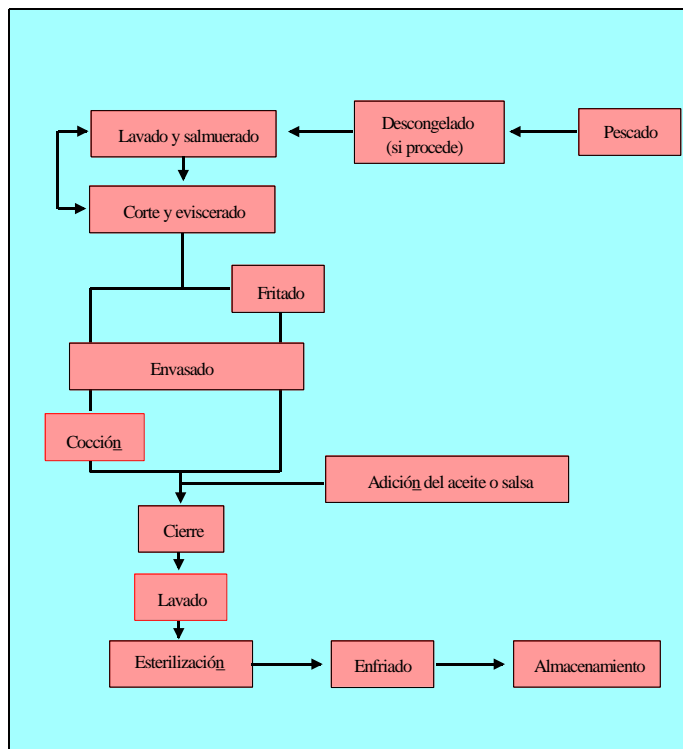


Imagen 3- Esquema general de la línea de elaboración de conservas de pescado.

El lavado y salmuero se puede hacer antes o después del corte y eviscerado, dependiendo de las preferencias por parte de la empresa. El eviscerado y corte de las sardinas grandes se hace generalmente de forma automática con una máquina "*nobbing*" (Imagen 4), aunque en Galicia sigue predominando el sistema manual. Las sardinas pequeñas (sardinilla) se evisceran manualmente. Para el baño en salmuera se utiliza una salmuera saturada, o ligera 3-5% con una permanencia más prolongada, donde se vierte directamente el pescado y es sometido a una ligera agitación que tiene por función asegurar el correcto contacto de todas las piezas con el líquido, asegurar el descamado por contacto de las piezas entre si y salar ligeramente el pescado, para que el músculo adquiera consistencia. El tiempo de

duración en inmersión es variable según cada empresa. Las sardinas cortadas, se empaican de forma manual en el envase correspondiente.

El paso siguiente consiste en una cocción, generalmente al vapor que va encaminada a reducir la tasa de humedad y la actividad de agua, para asegurar que no existan grandes salidas de agua tisular durante la siguiente fase de esterilización. Para ello, las latas con sardinas se voltean (con el fin de eliminar el agua) para que entren en una cinta continua en el equipo de cocción (continuo o cerrado), entre 90° y 100°C, y tiempo entre 15 y 30 min, según cada empresa, que estará en concordancia al tratamiento térmico posterior de esterilización.



Imagen 4. Elaboración de tronquitos de sardina automático.

Seguidamente se añade el aceite templado (en torno a 60°C, o simplemente a temperatura ambiente) para conseguir la expulsión del aire remanente entre las piezas de pescado en el envase y para que una vez cerradas las latas y al enfriar el aceite, se cree un pequeño espacio de cabecera que permita la correcta dilatación de la lata, al producirse la expansión del contenido durante la esterilización. El aceite usado normalmente como líquido de cobertura es de soja, girasol, oliva o

mezcla. Cuando penetra en el músculo, lo enriquece con sustancias de origen vegetal.

A continuación se realiza la esterilización en autoclave, que permite la destrucción o inactivación completa de los enzimas y bacterias (Sengör y col., 2004; Evangelista y col., 2016). En esta fase nos encontramos con otro de los puntos importantes en la modificación del producto final, de forma que la elección correcta de tiempos y temperaturas (entre 110° y 118°C según empresa) idóneas a la clase de materia prima, tamaño y cantidad de contenido de la lata es la que determinará la adecuada esterilización del producto y evitará alteraciones debidas a recociones o quemaduras que alteren olores y sabores del pescado enlatado. Pero importante según el envase a utilizar (metálico, plástico o vidrio) regular una correcta contrapresión con aire en el interior del autoclave. Existen varias modalidades de autoclaves según su diseño de incorporación de cestones con conservas (verticales u horizontales), o por el sistema de esterilización:

- Vapor saturado
- Vapor-aire
- Cortina de agua o sprays (ducha, Imagen 5).

Tras la esterilización, y en el mismo autoclave, se procede a un rápido enfriamiento de las latas, con un descenso progresivo de temperatura y de la presión (para evitar deformaciones de cierre o rotura de envases por abrefácil, por ejemplo).

La última etapa del proceso consiste en la “maduración” de la conserva mientras permanece almacenada para que se produzca la correcta estabilización del producto (la interacción entre el líquido de cobertura y el pescado envasado), por la necesidad de mantener las características organolépticas deseadas, reproducibles para una determinada marca comercial, durante el período de comercialización.

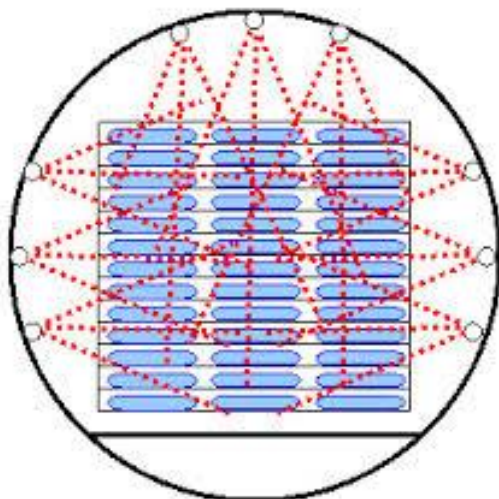


Imagen 5. Esquema de una sección de sistema esterilización de conservas de ducha o spray (utilizado en este trabajo).

Sin embargo, el tratamiento térmico provoca cambios tanto en las características organolépticas, directamente y evidente en color y textura de *Thunnus albacares* (Mohan y col., 2015; Frega y col., 2016), como en los principales componentes nutritivos, especialmente proteína (Navarro y García, 1996; Mohan y col., 2006). La desnaturalización térmica de las proteínas tiene una influencia directa sobre la textura del alimento; las reacciones químicas, o no enzimáticas inducidas por el calor, influyen sobre el color, el sabor y el olor (Fujii y col., 1973; Horner, 2001; Pacheco-Aguilar y col., 2000; Aubourg, 2001b; Aubourg y col., 2004; Méndez y col., 2006; Tahergorabi y col., 2011; Ferraro y col., 2013).

Los cambios más comunes en las proteínas son la pérdida de algunos aminoácidos esenciales y pérdida y/o mejora de la digestibilidad de ciertas proteínas (Silva y Chamul, 2000; Rodríguez y col., 2009; Tahergorabi y col., 2011). Los lípidos, especialmente los insaturados como son los del pescado, son propensos a la autooxidación cuando se calientan en presencia del oxígeno del aire, provocando pérdidas del valor nutritivo de ácidos grasos esenciales. También provocan la conversión de los ácidos grasos *cis* en *trans* por

isomerización, con lo que se produce una pérdida de la actividad biológica de los ácidos grasos esenciales como precursores de prostaglandinas y tromboxanos (Hui y col., 2012; Rasmussen y col., 2018).

Se ha demostrado que el color, el sabor y ocasionalmente los cambios estructurales están relacionados con la oxidación de grasas que puede producirse durante el tratamiento térmico y posterior almacenamiento (Ashton, 2002; Rodríguez y col., 2005). Todos estos cambios tienen una repercusión importante en el mercado, ya que los consumidores habituales de estos productos llegan a discernir estas anomalías (Majumdar y col., 2017).

Los minerales sufren pérdidas por lixiviación así como las vitaminas hidrosolubles que también se degradan por el calor. Sin embargo, las vitaminas liposolubles son más termoestables pero sufren pérdidas por la oxidación de lípidos (Prochaska y col., 2000; Hui y col., 2012). Por tanto, independientemente del grado de frescura de la materia prima, los parámetros tecnológicos de control de esterilización (tiempo/temperatura) son vitales para conseguir un producto en conserva de calidad (Simpson y col., 2003; Mohan y col., 2006; Awuah y col., 2007), así como la distribución y penetración del calor, donde el diseño y tecnologías del autoclave son estratégicos (Ansar y col., 2006), así como el tipo de material del envase y formato (Byun y col., 2010; Adepoju y col., 2017).

Actualmente, la Industria Conservera, y en concreto la dedicada a los productos de la pesca, desde hace tiempo tiende por seguridad alimentaria a ir incrementando el valor de letalidad, conocido como F_0 , para garantizar la inocuidad del producto, pero sin seguir un criterio científico, basándose en las probabilidades de poder recibir algún lote o partida de materia prima con una alta tasa de bacterias, en este caso teniendo en cuenta la probabilidad de que se disparen altos niveles de esporas de *Clostridium botulinum*, y su subsecuente formación de toxina. Si bien, esta toxina no es el problema ya que es termolábil, el problema radica en que resistan algunas esporas al tratamiento térmico, y por tanto puedan desarrollar toxina post-proceso. Hasta hace pocos años, la industria cárnica solventaba este problema con la adición de nitrito como conservante, si bien, su uso

está prohibido en el pescado por su formación de nitrosaminas, potencialmente cancerígenas (Groenen y col., 1982; Sen y col., 1985; Bulushi y col., 2009; Kose y col., 2010; Bhangare y col., 2015; Biji y col., 2016).

Realizar por parte de la empresa un control microbiológico de todas las materias primas, y a lo largo de las fases críticas intermedias, es prácticamente imposible, por lo que aún en un mismo lote, determinadas piezas pueden estar contaminadas y/o recontaminadas, si bien es cierto, que raramente se alcanzan poblaciones altas de estas bacterias, suficiente para formar toxina caso del *C. botulinum* o de alterar el producto (*Geobacillus stearothermophilus*) ya que hablando de estos niveles, habría ya cambios evidentes en las materias primas. Por otro lado, cada vez aumenta el uso de materia prima elaborada (atún cocido y limpio envasado al vacío y congelado) adquirida a terceros países, con mezcla de proveedores, lotes, lo que complica más un seguimiento analítico estricto, y en este tipo de materia prima, dependiendo de las condiciones de manipulación en origen, su flora bacteriana puede ser variada y además en condiciones ideales para el desarrollo de *C. botulinum*.

A pesar de ello, un fallo durante la esterilización, por muy simple que pudiese parecer, puede permitir la supervivencia de ciertas esporas bacterianas, y durante el almacenamiento de las conservas de pescado en anaquel, se dan las condiciones óptimas para su desarrollo: ambiente anaerobio, baja tasa de sal, temperatura moderada (mesófila), pH poco ácido, parámetros vitales de esta especie que están bien definidos (Schmidt y col., 1961; Baird-Parker y Fream, 1967; Lund y Wyatt, 1984; Gibson y col., 1987; Graham y col., 1997; Plowman y Peck, 2002). Aunque aquí juega un papel importante también la actividad de agua, que dependerá del estado de la materia prima, variables tecnológicas intermedias, .., la formación de toxina puede tener lugar en pocos días, por ejemplo 9 días a +10°C de almacenamiento en carne de cangrejo en conserva, pero en este caso pasteurizadas (Solomon y col., 1977).

En pescado refrigerado en atmósfera modificada (donde hay que tener en cuenta la presencia y desarrollo de otros microorganismos, posibles competidores), inoculando *C. botulinum* tipo E del orden de

10^4 ufc/g, la toxina se presenta en torno a los 18 días tras su almacenamiento a $+4^{\circ}\text{C}$, si bien los indicios sensoriales de deterioro son evidentes antes de la aparición de la toxina, mientras que a $+10^{\circ}\text{C}$, coinciden los signos de deterioro con la presencia de toxina, a los 6 días (Cai y col., 1997).

Tal y como la FDA (*Food Drug Administration*) americana reconoce en su web oficial, *“El tratamiento térmico necesario para ofrecer un producto alimenticio comercialmente estéril suele ser mayor que el necesario para ofrecer una reducción de 10^{12} ufc/g para Clostridium botulinum. Es responsabilidad de la industria desarrollar un tratamiento necesario de tiempo/temperatura para obtener un producto de alimentos en conserva de baja acidez comercialmente estériles”*, pero no ofrece unos valores basados en la realidad de cada producto, y ahí radica el problema, ya que la Industria se basa en estos argumentos o criterios de la FDA y no verifica realmente lo que ocurre con su producto determinado, y sobre todo que sea fiel reflejo de la carga bacteriana de sus materias primas. Asume pues la Industria Conservera, por regla general y como medida de precaución, aplicar valores de F_0 superiores a 10 min, como medida preventiva en su posterior almacenamiento.

Las metodologías para la validación de los procesos de alimentos en conserva de baja acidez han existido desde hace bastante tiempo. Los Organismos Reguladores requieren que los procesos programados deben ser establecidos por una persona u Organización que tenga el conocimiento experto de los requisitos de procesamiento térmico de alimentos envasados en recipientes herméticamente cerrados. La validación biológica de un proceso electrotérmico innovador o emergente en este campo, tal como calentamiento óhmico o calentamiento inductivo, puede ser diseñado y realizado siguiendo los procedimientos de validación biológicos convencionales de tratamiento por calor. Sin embargo, el modo de generación de calor, la distribución del calor y la ubicación del punto(s) más frío necesitan consideraciones especiales para validar un proceso electrotérmico y no pueden ser extrapolados a partir de procesos térmicos convencionales, por lo que es necesario un esfuerzo en el estudio de prevalencia de los microorganismos.

En el campo de las conservas de pescado, la Industria por lo general también se ajusta a los criterios de la FDA, basados muchos de ellos en ensayos *in vitro*, como el clásico trabajo de Odlaug y Pflug (1977). Sin embargo, el estudio del comportamiento/supervivencia concreto de *C. botulinum* según el valor de esterilización (F_0), no está bien y suficientemente documentado, donde los esfuerzos se dirigen a pescado envasado refrigerado (fresco o pasteurizado; Lynt y col., 1977; Eklund y col., 1988; Peterson y col., 1997; Silva y Gibbs, 2010). En casos concretos, los medios o estado de las conservas y/o tipo de producto alimentario para temperaturas similares arrojan valores variables. Así, ejemplo de ello son trabajos clásicos *in vitro* referentes a los primeros estudios de esterilización vinculados a la mortalidad de *C. botulinum*, con un valor de letalidad para 120°C de 6 min. (Lang y Dean, 1934), así como diversos trabajos en conserva (realmente productos pasteurizados almacenados en envases metálicos), relativos a la carne de cangrejo azul y otros pescados (Gates y col., 1990), o en pavo (Juneja y col., 1995).

Los grupos de bacterias que en estos últimos años cobran fuerza en diferentes partes del mundo (donde las condiciones higiénicas son pobres o existe un consumo de pescado poco elaborado), son los pertenecientes a especies de *Vibrio*, especialmente aquellas no vinculadas a contaminación fecal (*V. vulnificus*, por ejemplo; Fleming y col., 2006). Pero *Clostridium botulinum* tipo E, sigue siendo el organismo tóxico, mortal, más importante al menos en aguas marinas europeas. La presencia y supervivencia de esporas en los lodos de fondos marinos es la principal vía de contaminación de esta cepa en los productos de la pesca frescos (gracias a las corrientes marinas o simplemente por la vida demersal-bentónica), considerada como cepa natural en este medio ambiente, de ahí su resistencia a determinadas condiciones (salinidad alta frente a otras cepas más propias de zonas de suelos continentales), tal y como ya demostró Huss (1980), además de en aguas dulces (Hielm y col., 1998).

Fue en la década de los 70 del siglo XX cuando se profundiza en el estudio, resistencia y caracterización de esta bacteria, con apenas estudios relevantes en estas últimas décadas, salvo en productos relacionados con la conservación en refrigeración. Kautter y col.

(1974) ya establecen en muestras reales de cangrejo azul pasteurizado (*Callinectes sapidus*) que cada 1000 envases hay un esporo de *C. botulinum* tipo F. Este crustáceo vive en fondos marinos y causó problemas sanitarios por el consumo de los productos pasteurizados. La inoculación de *C. botulinum* tipo E en niveles del orden de 2×10^7 ufc/100 g y con pasteurizaciones hasta 90°C (y mantenimiento final de 1 min a esta temperatura), muestra que a partir de 71°C ya se inicia la reducción de esporos. Pero hay que ser prudentes, pues un almacenamiento *a posteriori* de 6 meses a 4°C hay muestras donde aparecen los microorganismos (Cockey y Tatro, 1974). Aplicando diversos parámetros (t°/T^a) de pasteurización con envases de 400 g de cangrejo azul (capacidad 500 ml), se estiman 18 min a 90°C como valor de letalidad efectivo, para pasteurización comercial (Dickerson y Berry, 1974); y no menos importante su posterior conservación refrigerada, donde algunas cepas de *C. botulinum* (B, E, y F) son capaces de formar toxina, a los 3 días a 26°C, o 14 días a 12°C. Sin embargo, a 4°C, las esporas supervivientes en estas semiconservas no germinan al menos hasta los 6 meses, pero las condiciones de refrigeración han de ser estrictas (Dickerson y Berry, 1976; Solomon y col., 1977).

Diao y col. (2014) estudian el valor $D_{121,1^\circ\text{C}}$ (tiempo requerido para reducir en 10 veces a escala logarítmica la tasa inicial, a 121,1 C) y el Valor Z (aumento de temperatura necesario para tener una disminución de 10 veces de los valores D) para las cepas de *C. botulinum* proteolítica y *C. sporogenes* no toxicogénico (PA3679), habituales en diversos productos de la pesca. Tras ensayos en medio neutro y líquido, concluyen que el $D_{121,1^\circ\text{C}}$ y Valor Z es de 0,19 min y 11,1°C, y de 1,28 min y de 11,3°C, para *C. botulinum* y *C. sporogenes*, respectivamente. Estos parámetros son similares en ambas cepas, y que serán aplicables a la configuración térmica para conseguir productos estables en medios de acidez baja. En medios de acidez alta (pH 4,6), como mejillones en diversas salsas, a pesar de contar con una carga bacteriana alta inicial frente a otros alimentos, una esterilización de 120°C y F_0 de 5,2 es suficiente para mostrar ausencia de patógenos (Sengör y col., 2004), pero son condiciones de tratamiento de esterilización excesivas a criterio de empresas gallegas

en cuenta a temperatura. Estos parámetros tecnológicos altos al final repercuten en las cualidades sensoriales. A pesar de todos estos conocimientos en la esterilización comercial de conservas, el riesgo está presente (Hyytiä y col., 1998), debiendo ser estrictos en el control térmico de acuerdo al formato del envase y tipo de producto (Reddy y col., 2006), estudio de puntos fríos en el autoclave (Dickerson y Berry, 1976), y especialmente atentos al Valor Z (Perkins y col., 1975).

Pero en la mayor parte de los casos, el principal causante de la alteración de los productos enlatados de baja acidez es *Geobacillus stearothermophilus*, cuyo origen puede estar en el suelo, y suele darse principalmente en productos vegetales (Nakano, 2015). André y col (2013) estudian la alteración de conservas de baja acidez (de todo tipo, pero con escasas muestras de pescado) y qué bacterias son las responsables tras una incubación a 55°C 7 días de conservas francesas, con una vida de anaquel de al menos 10 años, donde los valores F_0 de fabricación oscilan entre los 5 y 20 min. Demuestran que el 80% de los casos (y curiosamente en conservas vegetales) están generados por la presencia de especies de 3 géneros: *Moorella* (36%), *Geobacillus* (35%) y *Thermoanaerobacterium* (10%). En tasas menores han encontrado otros géneros poco habituales, pero respecto a *Clostridium*, escasos casos en productos grasos (patés), donde destaca *C. thermopalmarium*.

Pero para aplicar un tratamiento térmico adecuado a cada naturaleza de materia prima, hay que tener en cuenta su flora habitual y su cinética de inactivación térmica, especialmente en las especies formadoras de esporas, como *Bacillus*. Berendsen y col. (2015) han estudiado esta cinética para 40 cepas de *Bacillus subtilis*, otro microorganismo alterante típico en productos en conserva. Encuentran 2 grandes grupos de estas cepas, uno con promedio de 0,33 seg para el valor $D_{120^{\circ}\text{C}}$, y otro más resistente con un valor $D_{120^{\circ}\text{C}}$ de 45,7 seg. En el caso del valor D para las esporas más resistentes de *C. botulinum* (de interés como microorganismo patógeno y mortal) se comprobó en un medio neutro de fosfato a 121,1°C que era de 0,21 min, y para realizar una reducción de esporas logarítmica de orden 12 ($12D$), son precisos 2,52 min, de ahí que la Industria Conservera aplique como

mínimo un valor de F_0 de 3,0 min (siendo la referencia para el resto de microorganismos alterantes), teniendo en cuenta un calentamiento y enfriado rápidos (Hersom y Hulland, 1980).

En el caso de las conservas de productos del mar, la bacteria peligrosa más frecuente en casos de errores en la esterilización, es la cepa de *C. botulinum* tipo E, así que los esfuerzos se dirigen a este microorganismo y la Industria se cura en salud aplicando valores altos de valor F_0 de entre 6 y 15 min, partiendo de unas materias primas no analizadas microbiológicamente.

1.3. LA CALIDAD DEL PESCADO. EL PROBLEMA DEL CONCEPTO DE CALIDAD.

El término "*calidad*" es a menudo mal entendido porque su definición depende de las impresiones de una persona y en último grado, sobre lo que la persona concluye en lo concerniente a esa impresión. Por ello, diferentes personas frecuentemente tienen diferentes conceptos sobre el término calidad.

Si hacemos una revisión de algunas de las definiciones más comunes de calidad vemos que nos revelan dos puntos de vista mayoritarios. Primero, la calidad incluye todos los atributos, características y rasgos de un producto que el comprador, consumidor o usuario espera del producto. En consecuencia, la calidad respecto a alimentos procedentes del mar integra disponibilidad, seguridad (química y microbiológica), conveniencia, frescura, integridad y valor nutricional.

El otro punto se refiere al hecho por el cuál un producto de excelente calidad recibe altas expectativas por parte del comprador o usuario.

Botta (1995) define calidad como "*el grado de excelencia en el cuál un producto reúne todos los atributos, características y rasgos que el comprador y usuario del producto y los organismos de regulación esperan*". Con ésta definición remarca que la calidad es un concepto más amplio que el de un objeto específico o una sencilla realidad con una definición concreta, que viene determinada por el producto en particular y las razones por las que ha sido producido y

que depende del comprador y usuario del producto y del organismo que regule el producto.

Por todo esto se definen varios tipos de calidad como pueden ser la calidad higiénica (seguridad de los alimentos, es decir, que sean inocuos), calidad nutricional del producto para el consumidor, calidad comercial y calidad de frescura, tanto como si está procesado como si no.

A parte del valor nutricional y biológico que representa el pescado, el consumidor es exigente en la aceptación de este alimento esperando unas características sensoriales específicas que en definitiva es lo que determina la calidad (calidad sensorial) de un producto (Bremner y col., 2002). Para cumplir estas exigencias, el sector extractivo o productor debe mimar su pesca, mejorando sus hábitos durante la captura y posterior manipulación hasta su venta, de tal forma que el pescado llegue al consumidor en su máxima presentación sin merma en su valor biológico, es decir, la presentación ha de ser lo mejor posible (Oehlschäger, 2014).

Pero, ¿qué hace que una especie de pescado se sobrevalore más que otra?. Todo el mundo tiene en mente aquellas especies que son comestibles o de “calidad” y que habitualmente se encuentran en los mercados, en muchos casos asimilables a un alto coste económico. Pero todo esto tiene unas connotaciones o raíces culturales, etnográficas, fisiológicas, históricas, etc. que ha permitido que unas especies se comercialicen y revaloricen, mientras que otras no (Rodríguez, 2000b).

Todas las especies o productos del mar son en principio comestibles y por tanto comercializables. En Galicia es habitual consumir productos como percebes, pulpo, caramuxos, cigalas, ... productos que en otros países (norte de Europa) producen repulsión no aceptándolo si quiera como productos alimenticios. Sin embargo, es un hecho el que utilicen sus recursos para introducirlos en nuestro país. En este sentido, el pueblo japonés es de los más aprovechados, no desperdician nada de lo obtenido del mar. Así, aún hasta hace poco tiempo, productos como las algas, erizos, etc. no eran consumidos por los gallegos. Sin embargo, el conocimiento actual de las propiedades funcionales de algunos de estos productos, la nueva cocina

(*delicatessen*, diseño, dietas, ...), cambios culturales, etc., han llevado a un replanteamiento gastronómico por parte del pueblo español, sobre todo en las nuevas generaciones, y por consiguiente del criterio de calidad.

De entre las especies comerciales, algunas poseen precios muy bajos y por ello son de los productos más populares, bien porque su pesca permite capturar grandes cantidades con un mínimo esfuerzo humano y económico comparado con otras pesquerías. Este es el caso de jurel, sardina y caballa, especies que prácticamente se pueden disponer de ellas todo el año, pero dado su bajo coste el pescador captura lo máximo permitido. Y este esfuerzo pesquero se observa en las capturas de años siguientes, donde se aprecian un descenso en las capturas con lo cual, con este sistema se va a llegar a la extinción de ciertas pesquerías, como está ocurriendo con la sardina de la plataforma gallega.

Es preciso entender que este tipo de peces poseen un gran valor nutricional y sin embargo son considerados como productos de “*baja calidad, populares o baratos*”. Pero, ¿qué se entiende por un *pescado de calidad*?. ¿Una sardina por San Juan es de mejor calidad que una sardina capturada en Diciembre?. En este caso, mucha gente asocia calidad a un mayor contenido en grasa y no le importa pagar en ese momento 10 veces más por ese producto, pero hay otros factores históricos, sociológicos, etc. que influyen en este concepto (Imagen 6).

Para el Dr. C. Barros (comunicación personal), calidad es “*el criterio establecido por evaluación comparativa del conjunto de atributos o características apreciables organolépticamente, aunque objetivables, de un lote de productos genuinos, idóneos o ajustados a norma definitoria o a especificaciones caracterizantes, que hace que el consumidor muestre una tendencia categorizada hacia ellos en razón del impacto de aceptabilidad, lo que supone para este concepto una gran carga de subjetividad que puede haber tenido su origen en características geográficas, climatológicas, culturales, tradicionales, o como consecuencia de catástrofes, devastaciones, invasiones, guerras u otro tipo de influencias naturales o provocadas en el curso de la historia de los colectivos consumidores*”.

Sin embargo, aunque con menos grasa, el valor nutritivo de una sardina de Diciembre sigue siendo excelente, incluso tanto o más que una merluza, especie de mayor valor comercial.

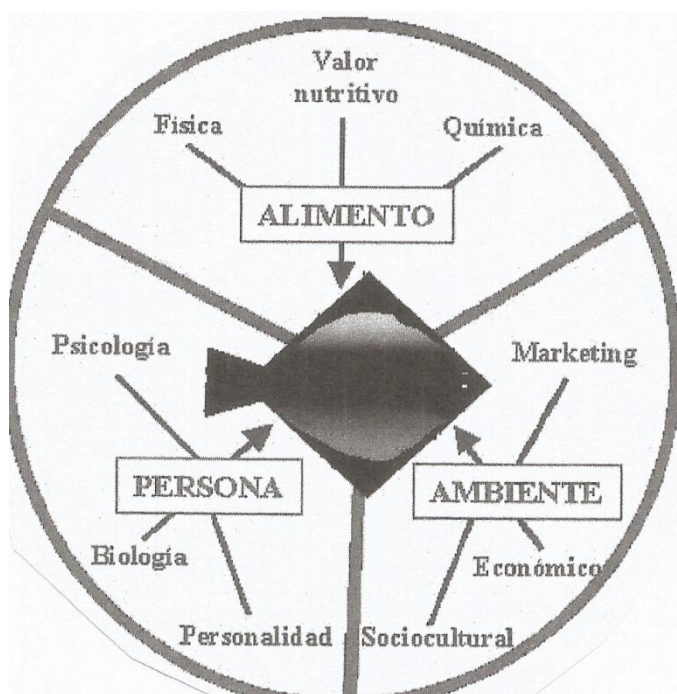


Imagen 6. Factores que influyen en la definición de un producto de calidad.
Fuente: Rodríguez, 2000a.

1.4. PARÁMETROS DE FRESCURA UTILIZADOS EN PESCADO.

El pescado fresco y sus productos transformados, concretamente las conservas de pescado, al ser un producto industrial en el que influyen varios factores propios del método de fabricación, el que sea un producto alimenticio y esté destinado a competir en un mercado, hacen que sean necesarios un serie de análisis o controles para determinar desde la calidad higiénico-sanitaria hasta su calidad como producto comercial destinado a la venta. Para ello se utilizan normalmente parámetros que determinan el grado de frescura y/o de

aptitud de la materia prima fresca, pudiendo ser físicos, químicos, microbiológicos y organolépticos.

Los métodos de naturaleza física para poder evaluar el grado de frescura presentan la ventaja de ser más rápidos, pero su fiabilidad es pobre en consideración de algunos autores, usándose por ello en ocasiones como métodos complementarios a los químicos, teniendo en cuenta que el producto a consumir sea fresco/refrigerado o congelado. Por ejemplo, entre los más conocidos, el pH (Abbas y col., 2008; Howgate, 2009), la textura, promoviendo el uso del Perfil Sensorial de Textura como el método más objetivo y completo (Szczeniak, 1998; Szczeniak, 2002, Bremner y col., 2002; Careche and Barroso, 2009), resistividad eléctrica (Pivarnik y col., 1990; Ochrem et al, 2014; Hassoun and Karoui, 2017), medida del color, especialmente orientado a subproductos y como resultado del efecto de procesados alimentarios (Schubring, 2009; Schubring, 2010) y medida del índice de refracción del humor vítreo (Yapara and Yetimb, 1998; Gokoglu and Yerlikaya, 2004).

Pero para poder establecer los parámetros adecuados a la hora de definir la idoneidad y grado de frescura de un pez, es preciso conocer los cambios bioquímicos que tienen lugar en el pescado tras su muerte.

1.4.1. Degradación *postmortem* del pescado.

Cuando se produce la muerte del pez, deja de actuar el sistema normal de regulación celular, cesando el suministro de O₂ y la producción de energía por glucólisis aerobia. Las células comienzan entonces una nueva serie de procesos importantes como son la degradación anaerobia de la glucosa y de los compuestos ricos en energía como son el adenosín-5'-trifosfato (ATP, Huss 1994) y el fosfato de creatina (PCr, Watabe y col., 1989; Watabe y col., 1991).

La acumulación de ácido láctico procedente de la glucólisis anaerobia, provoca un descenso del pH (Duran y col., 2008). Este descenso dependerá de varios factores, específicos e intraespecíficos que se describen a continuación.

Los niveles de glucógeno *in vivo* dependen del estado del ciclo reproductor en que se encuentre el pez (Huss 1994, Einen y Thomassen, 1998; Rathore y col., 2010):

- En los últimos momentos del estado de prefreza, el pez deja de alimentarse y las reservas lipídicas son transformadas y empleadas en la maduración gonadal, teniendo como resultado un alto contenido de agua en el músculo y un descenso de la cantidad de glucógeno almacenado (Watabe, 1991; Skejervoldy y col., 1999). Esto provoca tras la muerte del pez un descenso ligero del pH al acumularse poco ácido láctico en los especímenes capturados, dando lugar a una pérdida más rápida del grado de frescura durante el período de comercialización (Kristoffersen y col., 2006).
- Después de la freza, el pez comienza a alimentarse abundantemente y las cantidades de glucógeno alcanzan niveles muy elevados (Pascual y col., 1984). En este caso, al establecerse el *rigor mortis*, el pH cae rápidamente a valores muy bajos por formación de mayores cantidades de ácido láctico, induciendo "*a un mayor grado de rigor*". El pescado con un pH bajo se almacena por más tiempo durante la refrigeración (Ashie y col., 1996; Koutsoumanis, 2001).
- Durante el estado de reposo *in vivo*, los niveles de glucógeno vuelven a la normalidad (Pascual y col., 1984).

La regeneración del ATP está relacionada con el proceso anterior debido a que durante un corto período de tiempo tras la muerte, continúan los procesos normales de formación del ATP a partir de la cesión del grupo fosfato del PCr al ADP. La producción de ATP se detiene a medida que se agotan las reservas de glucógeno y PCr del músculo (Watabe y col., 1991; Lowe y col., 1993; Poli y col., 2005; Ocaño y col., 2011).

A bajos niveles de ATP, el *rigor mortis* se desarrolla antes ya que el funcionamiento de los canales de Ca^{2+} , ión que fija las proteínas de actina y miosina, es ATP-dependiente y no se produce la expulsión del mismo del sarcoplasma con lo que no se libera el complejo actomiosina establecido, quedando el músculo contraído, momento conocido como *rigor mortis* (Tsuchimoto y col., 1988a; Tsuchimoto y col., 1988b; Ushio y col., 1991; Benjakul y col., 1997; Tsuchimoto y col., 1998). En la Imagen 7 se resumen los procesos físico-químicos y estructurales que ocurren en el músculo de pescado tras la muerte hasta la consecución del *rigor mortis*.

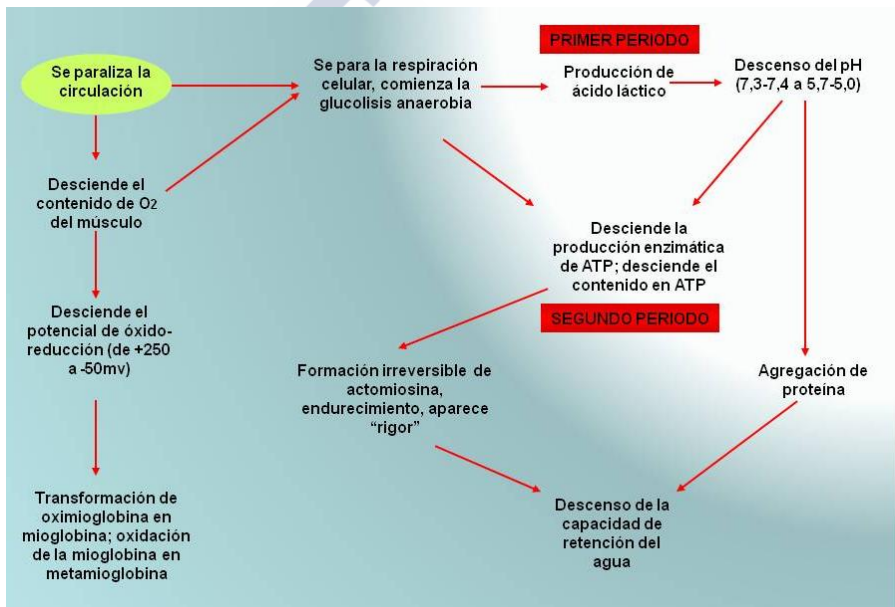


Imagen 7. Proceso de instauración del rigor mortis tras la captura del pescado.
Fuente: elaboración propia.

A modo de resumen, el establecimiento del *rigor mortis* depende del glucógeno almacenado presente en el músculo en el momento de la muerte del pez y de la cantidad de ATP y PCr iniciales, estando además influenciado por factores extrínsecos como la agresividad del método de captura, manipulación y temperatura de almacenamiento.

El pescado exhausto y almacenado a altas temperaturas entrará y pasará por la fase de rigor rápidamente debido al consumo más rápido del ATP durante la lucha (Huss, 1994; Lowe y col., 1993; Ocaño y col., 2011). Por otro lado, el descenso del pH produce la agregación de las proteínas y la activación de algunas proteasas musculares (catepsinas, con pH óptimo entre 5-6), comenzando los procesos de degradación ya durante el *rigor* (Delbarrey y col., 2006; Valls y Paredes, 2010; Sriket, 2014).

Después de que el rigor ha pasado, comienza la invasión bacteriana de la flora presente en piel y vísceras vía estructura de colágeno (Huss, 1994), produciendo la proteólisis mediante la acción de endopéptidasas y exopéptidasas, ayudada por la acción de enzimas autolíticos propios del pescado ya activados durante el establecimiento del *rigor mortis* (Pacheco-Aguilar y col., 2000; Marquez-Ríos, 2016).

Las bacterias producen diversos compuestos, destacando compuestos volátiles azufrados (CVS) a partir de cisteína y metionina (Varlet y Fernández, 2010), y aminas biógenas (AB) por la descarboxilación de algunos aminoácidos libres, que junto con otros productos de su degradación (trimetilamina-TMA y amoníaco-NH₃) incrementan progresivamente el pH (Ababouch y col., 1991; Ryder y col., 1993; Ruíz-Capillas y Moral, 2001; Nollet y Toldrá, 2009; Sanjuas y col., 2011), facilitando la actuación de otras bacterias que hasta el momento se hallaban inactivas por el pH bajo.

El óxido de trimetilamina (OTMA), uno de los compuestos nitrogenados no proteico más abundante en el pescado vivo, al degradarse por vía microbiana produce TMA (Castell y col., 1974; Gallardo, 1978; Smith y col., 1980; Tokunaga y col., 1982; Besteiro y col., 1993) que es la que confiere el típico olor a “pescado” durante el almacenamiento refrigerado prolongado (Gill, 1990; Kawai y Sakaguchi, 1996; Gram y Huss, 1996; Ruíz-Capillas y Moral 2001; Gram y Dalgaard, 2002; Gram, 2009; Bulushi y col., 2009). Todas estas reacciones se relacionan con un mecanismo de defensa bacteriano contra el pH ácido del medio y frente a otros grupos bacterianos (Gram, 2009).

El ATP por su parte, continúa su vía degradativa por los enzimas endógenos hasta llegar a la Inosina (HxR), donde la degradación a

hipoxantina (Hx) está influenciada por la actividad autolítica y bacteriana de la flora que procede de la piel y vísceras (Iwamoto y col., 1987; Gill, 1990; Benjakul y col., 1997; Sikorski y Kolakowski, 2000; Aubourg y col., 2007).

Respecto a la parte grasa del pez, está formada mayoritariamente por triacilglicéridos, constituidos en su mayoría por ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (>16 carbonos) que tienden fácilmente a enranciarse (Hui y col., 2006). Los procesos degradativos más importantes son los de autooxidación y lipólisis (Flick y col., 1992; Ghaly y col., 2010; Hui y col., 2012). La autólisis o lipólisis de la grasa produce glicerol y ácidos grasos libres, aunque esta vía es más lenta y poco frecuente (Ladiko y Lougovois, 1990; Smith y col., 1990). La autooxidación de los ácidos grasos no saturados, implica una alteración en las zonas de los dobles enlaces a hidroperóxidos y éstos a su vez producen aldehídos, cetonas y alcoholes al descomponerse su estructura (Ladiko y Lougovois, 1990; Refsgaard y col., 2000; Chaijal y col., 2006; Alghazeer y col., 2008).

Finalmente, todos estos cambios influyen en las características organolépticas tales como cambios de textura, color, olor y sabor, cualidades que evolucionan de diferente forma durante el tiempo que se almacena el pescado y que se utilizan como criterio evaluador a la hora de aceptar o no el pescado (Erickson, 1997; Haard, 2002; Venkateshwarlu y col., 2004; Cortesi y col., 2009; Hsu y col., 2014).

Pero para evitar este rápido deterioro del pescado pelágico recién capturado, además de una temperatura de refrigeración lo más baja posible, cercana a 0°C, se han aplicado técnicas para evitar la autooxidación como es el uso de antioxidantes naturales de origen vegetal (Kenar y col., 2010; Ozogul et al, 2011, Ozyurt y col., 2012), o para minimizar el desarrollo bacteriano con el empleo de bajas dosis de radiación, entre 1-2 kGy (Kasimoglu y col., 2003; Mbarki y col., 2009), y a pesar de su efectividad bacteriana o antioxidativa, los diferentes resultados a nivel sensorial (ganancia de 1 día de vida útil para jurel) no demuestran que sean unas técnicas de momento viables o que se puedan implantar a corto plazo.

Otras técnicas aplicadas al pescado fresco como las altas presiones (Matejkova, y col., 2013) y las atmósferas protectoras han

mostrado su eficacia en la ralentización del desarrollo bacteriano (y la formación de aminas biógenas), lo cual incrementa la vida útil en refrigeración, a pesar de que sus cualidades sensoriales se pueden hallar desvirtuadas (que no necesariamente desagradables) frente a las cualidades a las que el consumidor habitual está familiarizado.

Sin embargo, el empleo de agua de mar refrigerada y de hielo líquido inmediatamente tras la captura, disminuyendo rápidamente la temperatura del pescado hasta $-1,0^{\circ}\text{C}$, han mostrado ser eficaces en la prolongación de la vida útil de diferentes especies tanto salvajes como procedentes de la acuicultura (Johansen y col., 1996; Losada y col., 2004; Rodríguez y col., 2004; Rodríguez y col., 2005; Cakli y col., 2006a).

La instauración del *rigor mortis* está relacionada con la temperatura y el contenido de ATP, si bien, en *Pagrus major* el retraso en la instauración del *rigor mortis* está causado por las bajas temperaturas del hábitat (16°C), aunque la relación del progreso del *rigor mortis* y la degradación del ATP no está clara (Inoue y col., 1998). Cuando los animales se aclimatan a estas bajas temperaturas, tras su captura y almacenamiento en hielo, del 66% de ATP inicial, a las 8 h y 12 h, alcanzan rápidamente niveles elevados de IMP (75-90%) mientras que los peces que se aclimataron a temperaturas cálidas, entre $27-29^{\circ}\text{C}$, presentan todavía niveles altos de ATP (28%) y de IMP más bajo 58,7%, aunque al cabo de 24 horas no se aprecian diferencias significativas de derivados del ATP entre los lotes, con valores de IMP superiores al 85%, las purinas ($\text{HxR}+\text{Hx}$) en torno a 3% y de ATP $<3\%$.

Cuando un pescado fresco se deteriora, cuando pasa de *rigor mortis* a la disolución del rigor, comienza la autólisis, que finalmente favorece el deterioro bacteriano. La pérdida de frescura es causada principalmente por los cambios bioquímicos endógenos en el músculo, no tanto por la acción bacteriana, y que cuando ésta tiene lugar, el pescado ya posee cualidades sensoriales previas poco deseables para el consumidor. La frescura del pescado debe distinguirse del deterioro de pescado, asociado este último al deterioro bacteriano. Las primeras fases se conocen como frescura o cambios bioquímicos y las últimas fases como deterioro bacteriano (Saito y

col., 1959; Ehira y Uchiyama, 1986), donde el ATP juega un papel fundamental.

Los índices bioquímicos de frescura, y/o calidad comercial, relacionados con la degradación del ATP, adquieren especial atención (hipoxantina-Hx, y Valor K), para valorar la frescura del pescado especialmente vinculados al manejo y procesado tecnológico (Ryder, 1985; Hong y col., 2017). Los niveles de los nucleótidos y purinas derivadas del ATP se han usado ampliamente como índice de frescura antes del inicio del deterioro bacteriano (Wakao y Palma-Estrada, 1983; Ehira y Uchiyama, 1986). El Valor K es la relación de las purinas, últimos compuestos de la degradación autolítica del ATP, con la totalidad de los compuestos de dicha autólisis, es decir, en orden de degradación adenosín-5'-trifosfato (ATP), adenosín-5'-difosfato (ADP), adenosín-5'-monofosfato (AMP), inosina-5'-monofosfato (IMP), y las purinas inosina (HxR) e hipoxantina (Hx).

Tras la captura, en general, el valor K del pescado no suele superar el 10%, y este incremento se asocia únicamente a procesos enzimáticos endógenos. Se ha descrito en la literatura científica, que parte de la formación de Hx en últimas etapas de deterioro, dependiendo de la especie (Imagen 8) pero también se asocia a la actividad bacteriana, incrementándose rápidamente dicho valor (Hsu y col., 2014; Hong y col., 2017).

El límite de frescura adecuado u óptimo asociado a este parámetro bioquímico se establece en torno al 20%, y el punto de rechazo suele variar con la especie, pero de media ronda el 60% (Ehira, 1976). En el caso de especies de sardina almacenada en hielo, el valor K del 20% se alcanza al cabo de 6 días, y el 45% en torno al día 15 (Wakao y Palma-Estrada, 1983; Ehira y Uchiyama, 1986).

Sin embargo, tanto o más interés alcanzan los parámetros que estudian la degradación de la parte lipídica de la composición del pescado, siendo muchas veces, especialmente en producto congelado, los factores determinantes en la aptitud o rechazo del alimento. Los principales compuestos a tener en cuenta son el tipo de ácido graso de ese pescado y su cantidad. Esta composición depende de la alimentación en vivo y de la época de año, es decir, de su ciclo vital, pero para una misma especie, la temperatura es importante (Inoue y

col., 1998a), observando una mayor cantidad de ácido docohexanoico (DHA) en *Pagrus major* cuando se cría a temperaturas frías, al mismo tiempo que presenta más glicina, lisina e histidina dentro de su perfil de aminoácidos libres, los dos últimos precursores de cadaverina e histamina, respectivamente, y durante su comercialización postcaptura, presentará además una textura más firme que el criado a temperaturas moderadas. Quizás sea este uno de los factores que diferencian a la calidad sensorial de la sardina atlántica de la mediterránea por los datos de límite de aptitud tras su almacenamiento en hielo tradicional, mostrados por diferentes culturas como la española o la turca, además de la memoria gastronómica y de los gustos culturales.

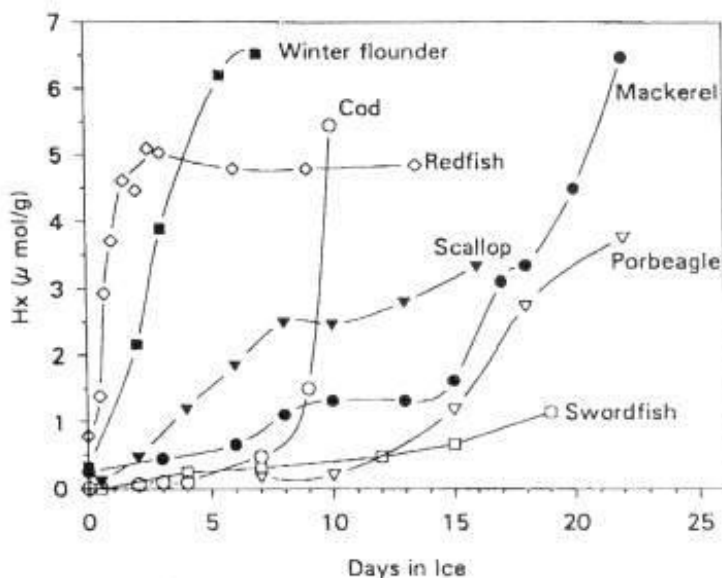


Imagen 8. Formación de Hx según la especie pesquera (fuente: Huss, 1994).

El proceso autolítico de la fracción grasa del pescado comienza con una lipólisis de los triacilglicéridos, liberando los ácidos grasos (Fernández y col., 1997), continúa con una autooxidación de las cadenas de ácidos grasos libres, y finalmente con la formación de moléculas de menor peso molecular tipo aldehídos, cetonas, ácidos

orgánicos, esterres, ..., así como la interacción de éstos con otras moléculas de carácter no graso del tejido del pez, como las proteínas o péptidos (Mariutti y Bragagnolo, 2017). Esta degradación lipídica adquiere mayor importancia, y por ende una mejor interpretación, en el caso de especies grasas o semigrasas, como es el caso de la sardina, jurel, caballa, arenque o diversas especies de túnidos. Estas especies, contienen mayor proporción de músculo oscuro o rojo (Guizani y col., 2014; Digre y col., 2015), zona por donde ya *in vivo* circulan mayor cantidad de ácidos grasos libres, aminoácidos libres, péptidos, aminos, ... como resultado de su metabolismo (Albrecht-Ruiz y Salas, 2015). Durante el almacenamiento *postmortem*, es en esta zona donde tendrán lugar los primeros mecanismos de degradación lipídica y bacteriana, a mayor velocidad que en el músculo blanco (Iversen, 2014), lo cual influirá en las cualidades sensoriales de este músculo, que habitualmente se caracteriza por unos sabores y sabores más intensos, desagradables para la mayor parte de consumidores, especialmente por sensaciones amargas, agrias, al tiempo que influirá en la calidad final de la parte grasa del pescado (Sikorki y Kolakowska, 1990; Kaewmanee y col., 2015).

Tanto los productores y comercializadores, como los consumidores de la sardina atlántica (*Sardina pilchardus*, Walb.), conocen la delicadeza de esta materia prima (especialmente en verano, que es cuando se incrementa su demanda, por razones históricas, culturales y etnográficas), con un alto grado de deterioro, lo cual se traduce en una especie muy sensible y perecedera frente a otras especies incluso grasas como las caballas o magras como la merluza, con un periodo de comercialización mayor en idénticas circunstancias de almacenamiento o conservación. Dado que es una especie económica importante en el mercado español, en el sentido de un producto de coste popular, barato, asociada a su ciclo de vida y por tanto gran volumen de captura en determinadas épocas del año (principalmente captura de cerco), los estudios de los cambios *postmortem* en la especie atlántica, con mayor tasa de grasa que la mediterránea en verano, no son muy abundantes y falta una reflejo completo o más exhaustivo de los mecanismos *postmortem* que tienen

lugar en esta especie infravalorada, y como éstos pueden afectar a su tratamiento tecnológico como pueda ser la elaboración de conservas.

Los parámetros empleados en determinar la frescura y/o deterioro del pescado incluyen: químicos/bioquímicos, físicos, microbiológicos, organolépticos, principalmente (Sikorski y col., 1990; Olafsdottir y col., 1997; Oehlenschläger, 2014; Al-Jasser y Al-Jasass, 2014), si bien, nuevas técnicas incrementan las posibilidades de información al respecto, como es el empleo de técnicas de fluorescencia (Hassoum y Caroui, 2015; Riso y col., 2017), el uso de nariz electrónica (di Natale y Olafsdottir, 2009), estudio del color del músculo (Imagen 9, Schubring, 2009), etc. Sin embargo, por su rapidez, reproducibilidad, resolución, ... las técnicas más empleadas son los parámetros químicos (Yamanaka y col., 1986; Wong y col., 1988; Yen y Hsieh, 1991; Olafsdottir y col., 1997; Alasalvar y col., 2001; Cheng y col., 2015).

Los análisis microbiológicos (imprescindibles por otro lado para garantizar la salud del consumidor y para explicar el por qué de muchos de los compuestos químicos analizados), son sencillos pero laboriosos y sus resultados suelen tardar hasta 5 días para determinados microbios, y ante el estudio de rutina de una partida o lote de pescado, cuando se interpretan y obtienen resultados, la materia prima ya ha sido comercializada y/o consumida. Como resumen, en la Imagen 10 se expone un esquema de la interrelación de cada componente químico del pescado en vida, qué procesos principales han lugar, así como la influencia de los compuestos de degradación finales en cada una de las cualidades sensoriales del pescado.

Sin embargo, el análisis sensorial sigue siendo uno de los principales y rápidos sistemas para evaluar la frescura o deterioro del pescado, siendo preciso el diseñar tablas específicas para cada una de las materias primas a tratar (Rodríguez y col., 1991; Cyprian y col., 2008; Howgate, 2011), si bien, es siempre interesante el considerar el criterio o evaluación del consumidor medio, que en el fondo es quien garantizará el éxito comercial de un producto pesquero (Altintzoglou y col., 2010).

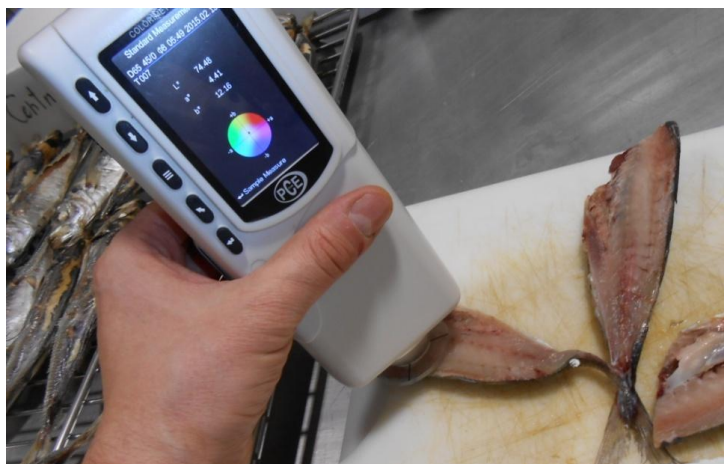


Imagen 9. Análisis de color con colorímetro según sistema CIE Lab

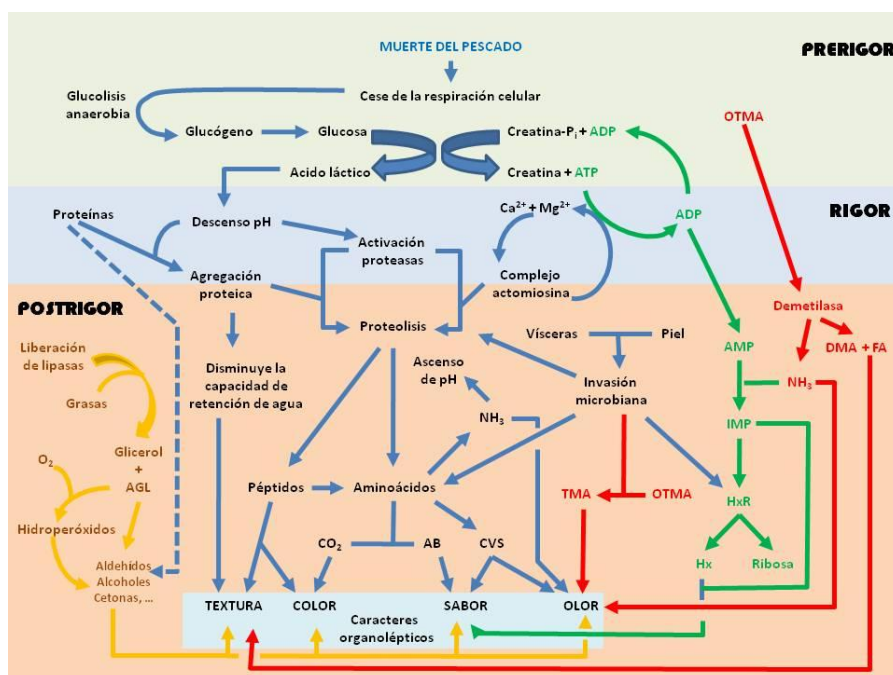


Imagen 10. Resumen de las etapas de degradación del pescado tras su captura.
Fuente: elaboración propia.

1.4.2. Parámetros sensoriales.

El análisis de las características organolépticas, las percibidas por los sentidos, es uno de los análisis mayormente utilizados en la evaluación de la calidad de alimentos en general y los productos del mar en particular. Son los sentidos los que determinan que un producto sea aceptado o no por los consumidores aunque sus condiciones higiénico-sanitarias sean o no correctas. Pero sólo mediante la aplicación exacta de test científicos podemos reproducir los resultados obtenidos y analizarlos estadísticamente (Amerine y col., 1965; Jellineck, 1985; Meilgaard y col., 2006).

Para ello se diseñan tablas con diferentes escalas con las características organolépticas del producto a las cuales se les asigna una puntuación que nos servirá, aplicando el tratamiento estadístico adecuado, para extraer conclusiones sobre dicho producto. El análisis sensorial de los alimentos se lleva a cabo de acuerdo con diferentes pruebas, según sea la finalidad para la que se efectúe. Existen tres tipos principales de pruebas: afectivas, discriminativas y descriptivas.

1. **Pruebas afectivas:** son aquellas en las cuales el juez expresa su reacción subjetiva ante el producto, indicando si le gusta o disgusta, si lo acepta o lo rechaza, o si lo prefiere a otro (Watts y col., 1992; Olivas y col., 2009).
2. **Pruebas discriminativas:** son aquellas en las que se desea establecer si hay diferencia o no entre dos o más muestras y, en algunos casos, la magnitud o importancia de esa diferencia (Carpenter y col., 2002; Olivas y col., 2009).
3. **Pruebas descriptivas:** Se trata de definir las propiedades del alimento y medirlas de la manera más objetiva posible. En éste tipo de pruebas es importante saber cuál es la magnitud o intensidad de los atributos del alimento (Murray y col., 2001).

Cada una de estas pruebas posee diferentes tests específicos dependiendo de la utilidad que se busque con el análisis y el tipo de alimento que se use (AENOR, 2010).

También es muy útil, si éste es realizado correctamente, como uno de los mejores indicadores del estado de frescura en que se

encuentra el pescado, teniendo una buena correlación con muchos de los parámetros químicos que habitualmente se usan para evaluar el grado de frescura del pescado.

Se conocen por propiedades sensoriales, los atributos de los alimentos que se detectan por los sentidos. Algunas se detectan por uno, mientras que otras se perciben por dos o más (Imagen 11), (Jellineck, 1985; Anzaldúa-Morales 1994; Ares y col., 2010).

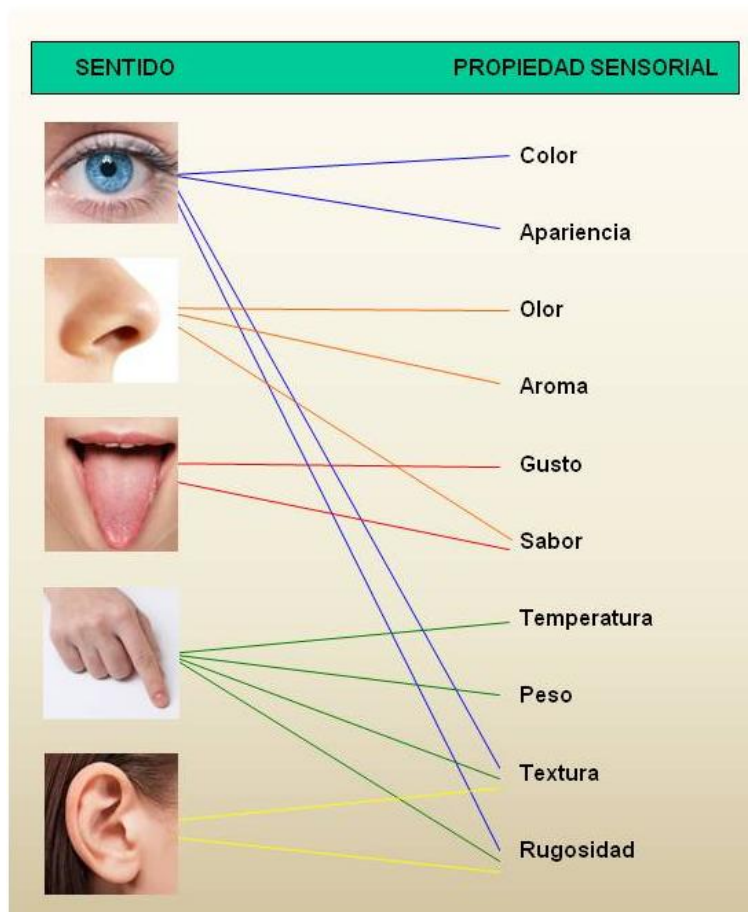


Imagen 11. Relación entre los sentidos y las propiedades sensoriales.

La evolución de éstos a lo largo del proceso de deterioro del pescado es significativo del estado de frescura en el que éste se encuentra y de su calidad, siendo posteriormente confirmado por los parámetros químicos analizados (Olafsdottir y col., 1997; Alasalvar, 2001). Así, son frecuentes el desarrollo de baremos cuantitativos descriptivos para definir sensorialmente la calidad del pescado de forma rápida, de especial interés para la Industria (Martinsdottir y col., 2001; Martinsdottir y col., 2002; Barbosa y Vaz-Pires; 2004; Campus y col., 2011; , pero hay que ser cuidadosos, ya que ésta será la CALIDAD SENSORIAL, que no exime que el pescado esté contaminado por metales pesados por encima de los niveles límite, o con productos tóxicos (hidrocarburos aromáticos policíclicos), con histamina o bacterias patógenas, sin que se manifiesten atributos sensoriales negativos, es decir, será de calidad sensorial, pero será insalubre, no inocuos.

El investigador A. Andalzúa-Morales en su libro "*La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y en la práctica*" relata un ejemplo representativo de esta importancia, cuando un prestigioso instituto de investigación efectuó un estudio para desarrollar una bebida en polvo altamente nutritiva. Esta cumplía los requerimientos correctos de valor nutritivo, calidad química e higiénica. Sin embargo, las características sensoriales del producto no fueron evaluadas adecuadamente. El alimento fue distribuido gratuitamente en comunidades con carencias nutricionales. Posteriormente, los investigadores visitaron las comunidades para evaluar el efecto del nuevo alimento sobre el nivel de nutrición de los habitantes, encontrándose que éstos estaban usando el polvo ¡para señalar los campos de fútbol!.

1.4.3. Parámetros químicos.

Dentro de los parámetros químicos de control en pescado fresco/refrigerado, los más usados para la evaluación del pescado son los que utilizan la determinación de los compuestos de naturaleza nitrogenada (Ke y col., 1990); como puede ser la determinación de la cantidad de **nitrógeno no proteico** (NNP), que engloba al óxido de trimetilamina (OTMA), trimetilamina (TMA), dimetilamina (DMA),

monometilamina (MMA), urea, péptidos, aminoácidos libres, nucleótidos, compuestos de bases púricas y derivados de la guanidina (creatina y arginina) (Oehlenschläger, 1997; Oehlenschläger, 2014). Por definición, el nitrógeno no proteico procede de los componentes que no son precipitables por el ácido tricloroacético y comprende entre el 0,5 % y 1 % del peso húmedo total del músculo. Su determinación se basa en el método Kjendhal de análisis de proteína por digestión química. Esta determinación es aplicable a todos los productos pesqueros.

La **Bases Volátiles Totales** (BVT o BVT-en inglés, Imagen 12) es otro de los parámetros químicos más utilizados, indicando los valores bajos una elevada frescura del pescado (Taguchi y col., 1982; El Marrakchi y col., 1989; Gallardo y col., 1990; Rodríguez y col., 1991; Besteiro y col., 1993; Howgate, 2010a), si bien, su utilidad, como el resto de parámetros químicos, tendrá sus detractores, con sus ventajas y desventajas (Cheng y col., 2015).

Chemical and microbial analysis

Haddock fillets stored at 0°C, 7°C and 15°C

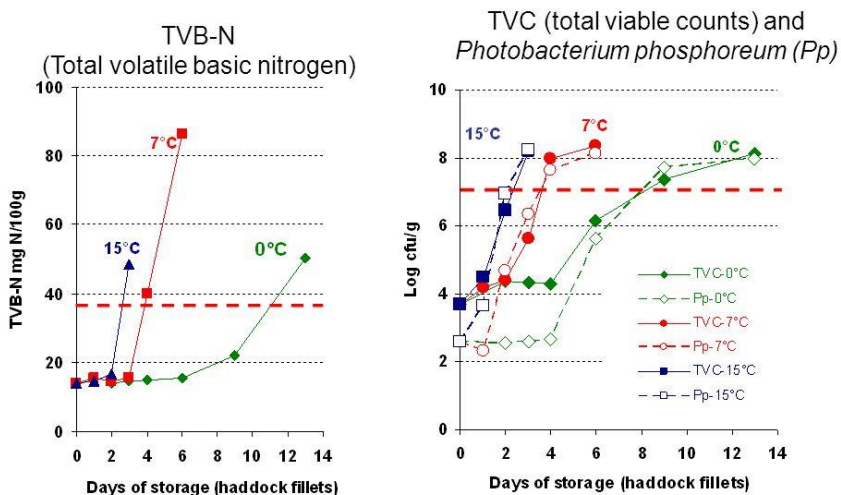


Imagen 12. Generación de BVT y desarrollo bacteriano en abadejo según temperatura de almacenamiento (fuente: Olafsdottir y col., 2006)

En cualquier caso, nos da una idea clara del estado de deterioro de la materia prima. Engloba una serie de compuestos de naturaleza nitrogenada derivados tanto de la degradación bacteriana como de la enzimática autolítica (Gallardo y col., 1990; Olafsdottir y col., 1997; Pivarnik y col., 2001); estos compuestos que forman parte de las BVT son mayoritariamente amoníaco, y en menor proporción TMA y DMA. Su evaluación se realiza de acuerdo con el método de destilación y posterior valoración ácido-base de Antonacopoulos y Vyncke (1989). Pivarnik y col. (2001) desarrollan un método basado en un electrodo químico.

El amoníaco procede de la desaminación bacteriana de los aminoácidos libres, procedentes de la degradación de las proteínas y otros compuestos minoritarios como purinas y nucleótidos (Howgate, 2010b).

Otro de los principales compuestos de naturaleza nitrogenada es el OTMA, compuesto que se encuentra ampliamente distribuido en animales marinos *in vivo* y su función se relaciona con la regulación osmótica (Strom, 1979; Parkin y Hultin, 1986; Anthoni y col., 1990; Sotelo y Rehbein, 2000). Diversos autores indican que existen diferencias en la cantidad de OTMA acumulada en diferentes especies, en el tipo de músculo (oscuro y claro, Tokunaga y col., 1970, Strom, 1979; Nunes y col., 1992) y también se han observado fluctuaciones estacionales (Samerotte y col., 2007).

La **Trimetilamina** (TMA) es uno de los compuestos englobados dentro de la BVT. Procede de la reducción del óxido de Trimetilamina por la acción de la flora bacteriana que coloniza de forma natural el pescado (Ocaño-Higuera y col., 2011). Debido al crecimiento bacteriano de la flora del pescado con actividad OTMA reductasa (Sotelo y Rehbein, 2000), el TMA es la vía degradativa mayoritaria para el pescado almacenado en refrigeración (El Marrakchi y col., 1989; Gallardo y col., 1990). A fecha actual todavía se usa el método espectrofotométrico de Dyer (1959), si bien, ya es tendencia el uso de la cromatografía gaseosa para su determinación junto con la DMA (Chan y col., 2006; Dhaouali y col., 2007).

Malle y Poumeyrol (1989) proponen el uso de la relación de TMA respecto a BVT como parámetro de control, denominado Valor P,

pero depende de las condiciones de almacenamiento y según la especie, que en su caso realiza el ensayo con 3 especies a 6-8°C, pero esta relación puede ser más que dudosa cuando el pescado se almacena correctamente con hielo, o en atmósferas protectoras.

Por otro lado, la **Dimetilamina** (DMA) se produce de forma autolítica a expensas del OTMA. Cuando el pescado está congelado, se inhibe el crecimiento bacteriano y se favorece la acción de la enzima OTMA-demetilasa, que es activa a bajas temperaturas (sólo se inactiva por calor); la OTMA-demetilasa produce menores cantidades de DMA a medida que la temperatura aumenta. La actividad de esta enzima produce cantidades equimolares de DMA y de **formaldehído** (FA) a partir del OTMA (Castell y col., 1974; Veciana, 1993; Rey-Mansilla, 2002; Noordiana y col., 2011).

Varias especies de pescado exhiben diferente actividad OTMA-asa, siendo los gádidos de las especies que alcanzan una mayor actividad (Rey-Mansilla, 2002). El FA causa una disminución en la proteína extraíble, deteriorando la textura del pescado al unirse covalentemente con la proteína, disminuyendo la capacidad de retención del agua de ésta, generando desagradables cualidades organolépticas (Castell y col., 1974; Hsu y col., 1993; Sikorski y Kolawoski, 2000; Hui y col., 2012).

Por otro lado, el formaldehído es difícil de extraer cuantitativamente porque se asocia a otros compuestos del pescado, lo que produce mediciones poco exactas y reproducibles, aunque existen métodos para medirlo por espectrofotometría (Ke y col., 1990) y cromatografía líquida de alta eficacia o CLAE (Noordiana y col., 2011). Por ello, la cantidad de DMA es a menudo reconocida como un indicador de la calidad del pescado congelado en especies donde se presenta alta actividad OTMA-asa, pudiendo reflejar la cantidad de FA formado. Tanto la TMA como la DMA, además de ser útiles para determinar el grado de deterioro, también nos pueden indicar la causa a la que es debido este deterioro.

Otros compuestos nitrogenados usados para conocer el grado de frescura son las **aminas no volátiles** o **aminas biógenas**. Estas aminas, se producen inicialmente por descarboxilación de los aminoácidos libres del músculo, que se liberan durante la proteólisis

debida a enzimas endógenos o de bacterias que forman parte de la flora del pescado.

Se forman mediante la eliminación del grupo carboxilo del aminoácido por enzimas aminoácido-descarboxilasa bacterianas y autolíticas. La cantidad de aminoácidos precursores libres en el tejido muscular es un factor importante en la formación de aminas biógenas. Esta cantidad de aminoácidos dependerá de la composición de las proteínas y de la cantidad libre que exista en el músculo, cantidad que depende de la especie (Ababouch y col., 1991; Santos, 1996; Chong y col., 2014; Suzzi y Torriani, 2015; Wang y col., 2018). El método habitual de identificación y su cuantificación sigue siendo la CLAE, siendo el clásico método de Mietz y Karmas (1978) el precursor que ha dado origen a nuevas modalidades, teniendo en cuenta que las fases estáticas del sistema han evolucionado exponencialmente en estas últimas décadas, lo que mejora su resolución (Gill y Thompson, 1984; Veciana y col., 1995; Gallardo y col., 1997; Ozöglü y col., 2000a; Ozöglü y col., 2002). Interesante la revisión realizada por Onal y col. (2013) en este sentido. Otros métodos recientes son los que se basan en ensayos por ELISA, electroforesis capilar (Muscarella y col., 2005) y biosensores amperométricos (Keow y col., 2007). En este sentido se ha desarrollado un biosensor comercial BIOFISH de la empresa española BIOLAN, de amplio uso en empresas de tñidos.

Aunque la formación de aminas biógenas por la actividad descarboxilasa de los microorganismos es la forma más comúnmente aceptada, algunos autores señalan otras vías de formación alternativas como la aminación de aldehídos o cetonas, la ruptura hidrolítica de poliaminas o desalquilaciones de aminas secundarias y terciarias (Biji y col., 2011; Douen y col., 2016; Wang y col., 2017; Aflaki y col., 2017).

La importancia de las aminas biógenas, a parte de su interés como indicadores del estado de alteración, es debida al interés toxicológico que algunas presentan, tanto directamente (histamina y tiramina) como indirectamente (cadaverina y putrescina), actuando como potenciadores de la histamina en casos de intoxicación o escombrotóxicos (Taylor y col., 1989; Ababouch y col., 1991; Veciana, 1993; Zare y col., 2015; Biji y col., 2016).

Los casos más frecuentes han aparecido por ingestión de músculo de pescado, fundamentalmente de las familias *Scombridae* (atún, caballa) y *Clupeidae* (sardina, boquerón) (Veciana y col., 1989; Ababouch y col., 1991; Morrow y col., 1991; Lopez-Sabater y col., 1996; Kim y col., 2005).

El hecho de que los escómbridos y cupleidos estén relacionados con la aparición de brotes de escombrotóxicos, se asoció a las elevadas cantidades de aminoácidos básicos, entre ellos la histidina, que es el precursor de la histamina lo que produciría un gran cantidad de aminas biógenas, en particular histamina (Ababouch y col., 1991; Morrow y col., 1991; López-Sabater y col., 1994; Auerswald y col., 2006; Visciano y col., 2007).

Las aminas no volátiles más importantes por sus efectos toxicológicos son la histamina y la tiramina, de hecho, ambas actúan de forma sinérgica (del Río y col., 2017). Otras aminas como son putrescina, β -feniletilamina, cadaverina, espermina y espermidina, pueden actuar como potenciadores de la ingesta de la histamina (Ababouch y col., 1991). Los efectos toxicológicos de la intoxicación histamínica son (Taylor y col., 1989; Morrow y col., 1991; Bulushi y col., 2009; Biji y col., 2016):

- Gastrointestinales: náuseas, vómitos, diarrea y digestión pesada.
- Neurológicos: cefaleas, palpitaciones, rubor, prurito, ardor y picor.
- Hemodinámicos: hipotensión.
- Cutáneos: Sarpullido, urticaria, edema e inflamación localizados.
- La tiramina y la β -feniletilamina estarían implicadas en migrañas de origen alimentario.

Estos síntomas se pueden manifestar en mayor o menor grado conjuntamente y algunos no manifestarse (Veciana, 1993). El mecanismo del efecto de penetración de la histamina en el organismo no se conoce con precisión pero se han enunciado dos hipótesis:

- La primera hace referencia a la inhibición de los enzimas de degradación de la histamina que se encuentran en diferentes tejidos corporales (Diaminooxidasa-DAO y N-metiltransferasa-HMT), cuando las aminas consiguen traspasar la mucosa intestinal. Se ha comprobado que la β -feniletilamina y la triptamina son inhibidores de la NMT y la putrescina de la DAO. Por el contrario, tiramina y cadaverina son inhibidores de ambos complejos enzimáticos. Cuando se produce el bloqueo parcial de los mecanismos principales de destoxificación, aumenta la absorción de la histamina a nivel intestinal, lo que aumentaría su vida media en el torrente sanguíneo (Taylor y col., 1989; Morrow y col., 1991).
- La segunda hipótesis, llamada "*hipótesis de la interrupción de barrera*", se basa en la competencia por los lugares de unión a la mucosa intestinal. Se sugiere que las sustancias como la putrescina y cadaverina podrían interferir en la función protectora de la mucosa intestinal, impidiendo la unión con la histamina y favoreciendo así la absorción de la misma (Morrow y col., 1991).

Cada una de éstas aminas biógenas procede de un aminoácido determinado, siendo las vías de generación más importantes las representadas en la Imagen 13 (Veciana 1993).

También se han descrito otras aminas biógenas en peces de agua dulce como la pyrrolidina y la piperidina (Chinivasagam y col., 1998; Kose, 2010), así como en otros animales marinos: octopina en cefalópodos, homarina en crustáceos y moluscos, y trigonelina en moluscos (Shahidi, 1994; Sikorski y Kolawaski, 2000; Mendes y col, 2001).

La mayoría de las bacterias productoras de enzimas aminoácido-descarboxilasa pertenecen al grupo de los mesófilos y psicrófilos (Wendakoon 1993; Gennari y col., 1999; Mendes y Sakaguchi, 1999; Paleologos y col., 2004; Emborg y col., 2005; Erkan y Ozden, 2008; Kim y col., 2009). Los enzimas descarboxilásicos están ampliamente distribuidos en los microorganismos, especialmente en los de la

familia *Enterobacteriaceae* (Eitenmiller y col., 1981; Koutsoumanis y col., 1999; Guizani y col., 2005).

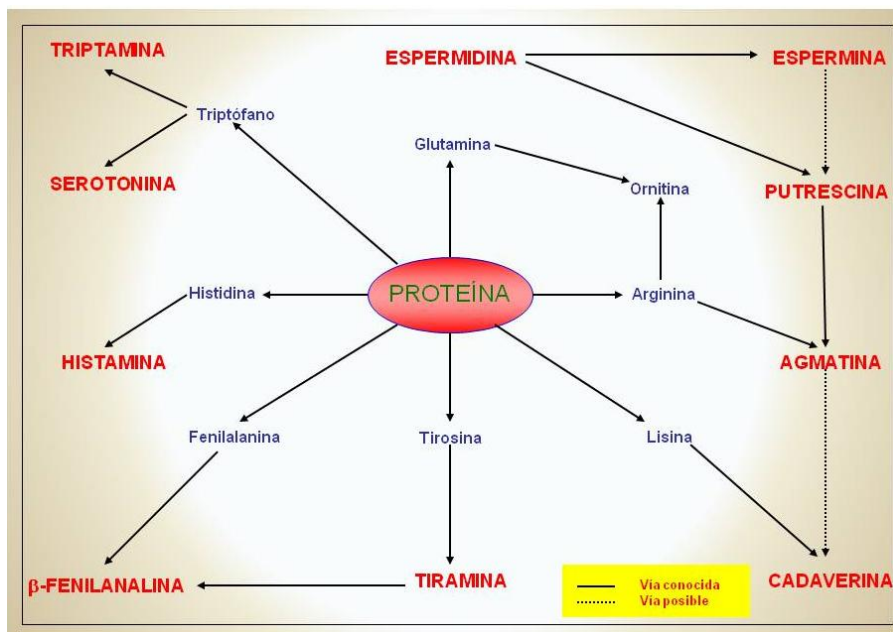


Imagen 13. Vías de formación de aminas biógenas a partir de sus precursores.
Fuente: elaboración propia.

Se reconocen como bacterias productoras de histamina: *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella spp*, *Hafnia alvei*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri*, *Proteus spp*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio spp*, *Aeromonas spp*, *Acinetobacter spp* y *Citrobacter freundii* (Leitao y col., 1983; López-Sabater y col., 1996; Kim y col., 2002; Kim y col., 2003; Kim y col., 2005; Kim y col., 2009; Visciano y col., 2012). Las bacterias productoras de histamina más frecuentes (sobretudo dominan estudios en túnidos y caballa) durante el almacenamiento de pescado en hielo o refrigeración son: *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas spp*, *Enterobacterias*, *Aeromonas hydrophila*,

Aeromonas spp., *Vibrio alginoliticus*, *Vibrio spp*, *Acinetobacter iwoffii*, *Acinetobacter spp*, *Proteus morganii*, *Citrobacter feundii*, *Alteromonas spp* (Wendakoon y Sakaguchi, 1993; Ben-Gigirey y col., 1999; Kim y col., 2000; Chen y col., 2008; Emborg y Dalgaard, 2008a; Emborg y Dalgaard, 2008b; Gram, 2009; Hsu y col., 2009).

La temperatura óptima de crecimiento de *Proteus morganii* es de +37°C, siendo su actividad prácticamente nula a +4°C y moderada a estas temperaturas para *Klebsiella pneumoniae*. Además se encontraron algunas cepas de *Clostridium perfringens*, las cuales crecían a temperatura moderada (+15/+20°C) pero eran productoras de Histidina-d Descarboxilasas a bajas temperaturas (+4°C) (Cheng y col., 2008).

La higiene también es un factor importante en la aparición de bacterias con actividad aminoácido-d Descarboxilasa, puesto que además de la flora microbiana normal de estos animales (*Pseudomonas*, *Proteus*, *Achromobacter*, *Alterobacter*, *Shewanella*, *Flavobacterium*, *Vibrio* y *Bacillus*) aparecen en el pescado Enterobacterias (*Enterobacters spp*, *Enterococcus spp*) y especies de *Staphylococcus*, *Clostridium* y *Lactobacillus*, como consecuencia de contaminaciones externas durante la captura, manipulado y posterior procesado (Mendes y col.; 1999; Hernández-Herrero y col., 1999; Kung y col., 2007; Gram, 2009; Françoise, 2010; Visciano y col., 2012).

Ababouch y col. (1991) observaron que a pesar de las precauciones tomadas para evitar la contaminación postcaptura, el 92,7 % de la flora formadora de histamina aislada pertenecía a la familia de las Enterobacterias, indicando que estas bacterias podrían ser constituyentes de la flora habitual del pescado debido a la frecuencia con la que fueron aislados.

Hay que señalar en este punto, que aunque se ha constatado que el músculo de pescado es estéril cuando está vivo (Huss, 1994), tras la captura pueden encontrarse bacterias productoras de histamina en la piel, agallas e intestinos que durante el almacenamiento pueden invadir y crecer rápidamente en el músculo de pescado (Ababouch y col.; 1991, Gennari y col., 1999). Esta invasión se ve favorecida por el método de captura, que pueden producir roturas tanto en la piel como en la cavidad abdominal de algunas piezas durante dicha captura, o

van invadiendo el músculo con el transcurrir del tiempo durante el almacenamiento.

Por tanto, a modo de resumen, la presencia de cantidades más o menos elevadas de aminos biógenas en pescado fresco o transformado se debe a varias causas como son: la composición de la especie (cantidad de aminoácidos libres), estado de frescura del pescado, grado de contaminación del mismo, el tiempo y la temperatura de almacenamiento, la actividad de agua (cuando es alta favorece el crecimiento bacteriano), el pH (los microorganismos proteolíticos se desarrollan bien en valores de pH entre 6 y 6,5); la tasa de sal y el tratamiento postcaptura.

Se han encontrado bajas concentraciones de aminos biógenas cuando el pescado está fresco, aumentando a medida que progresa la descomposición. Esta relación entre la descomposición y el nivel de aminos no volátiles nos permite su posible uso como indicadores del estado de frescura.

Existen otros productos de degradación de diferente naturaleza química además de los que ya hemos hecho referencia, como son los compuestos volátiles que contienen azufre como dimetilsulfuro. Estos compuestos son resultado de la actividad enzimática, especialmente vía bacteriana (Varlet y Fernandez, 2010; Levin, 2016; Boziaris y Parlapani, 2017), realizando su identificación y cuantificación por CG (San Roman y col., 2014). Otros menos utilizados son el contenido de etanol de origen bacteriano (Kelleher y Zall, 1983).

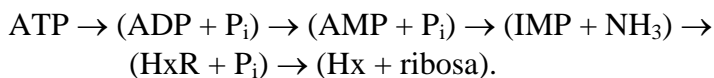
A medida que avanza el estado de deterioro del pescado se produce la **degradación lipídica** por dos vías mayoritarias (Shahidi, 2016):

- la lipólisis (hidrólisis), vía enzimática,
- y la oxidación, formándose peróxidos (hidroperóxidos), los cuales a su vez producen en su degradación aldehídos (malondialdehído y otros), cetonas, compuestos carbonílicos, hidrocarburos de cadena corta (Chaijal y col., 2006; Alghazeer y col., 2008; Banerjee y col., 2017).

La lipólisis y oxidación pueden producirse por vía enzimática y no enzimática. La hidrólisis tiene lugar principalmente a través de las lipasas propias del pescado. Inicada esta etapa, el proceso continua con la oxidación por los puntos de los dobles enlaces de los ácidos grasos liberados, es la autooxidación, pero la acción de la luz y enzimas catalizadores como la lipoxigenasa, también producen peróxidos (Shahidi, 2016); a ello sumar la oxidación de la mioglobina del músculo, la cual activa también el inicio de la oxidación lipídica (Zheng y col., 2016). Este proceso de enranciamiento produce olores y sabores desagradables que deterioran la calidad organoléptica del pescado, tanto en fresco como en el pescado procesado de diferentes formas, por ejemplo, conserva, ahumados, salazones, etc. (Cortesi y col., 2009; Hsu y col., 2014).

Hay diversos métodos que valoran el grado de oxidación del pescado, destacando **Índice del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA)** por espectrofotometría desarrollado por Tarladgis y Watts (1960) y posteriormente mejorado por otros autores (Pikul y col., 1989; Hassoun y Karoui, 2017), seguido por el **Índice o Valor de Peróxidos** aunque en desuso (método iodimétrico original de Lea, 1952, citado por Ke y col., 1990; Ozogul y col., 2005; Cheng y col., 2015; Banerjee y col., 2017), los **Ácidos Grasos Libres (FFA)** por CG. (Aubourg, 1998), el **Valor de Carbonilos** por colorimetría (Watanabe, 1974), así como pequeños **compuestos de carbono** tipo de aldehídos, cetonas, pentano, etc. por CG (Gokoglu y Verlikaya, 2015), medida de la **fluorescencia** (Smith y col., 1990), etc.

Otros parámetros químicos útiles para evaluar el grado de frescura del pescado pero de naturaleza diferente al nitrógeno o grasas antes vistas, serían, como algunos autores proponen, la determinación de los **5'-nucleótidos y purinas derivados del ATP** (Saito y col., 1959; Jones y Murray, 1964; Iwamoto y col., 1987; Gill, 1990). A medida que progresa el deterioro del pescado el ATP se va degradando por la actividad enzimática tanto de la flora bacteriana como autolítica en los diferentes compuestos de degradación del ATP, teniendo la cadena la siguiente secuencia:



Son considerados buenos indicadores del grado de frescura para algunas especies ya que depende de varios factores como pueden ser el método de captura o el tratamiento a bordo, que pueden reducir considerablemente la cantidad de ATP inicial (Jones, 1964; Gill y col., 1987; Obatake y col., 1988; Rodríguez y col., 1996).

La técnica más comúnmente aplicada para la determinación de los nucleótidos es la de CLAE, aunque se han descrito otros métodos de diferente naturaleza, como el enzimático para la determinación de Hipoxantina (Itoh y col., 2013).

Las diferencias de degradación del ATP observadas en diferentes especies de pescado se han asociado al tipo de músculo, o en la proporciones de éstos (músculo blanco y rojo), más rápido por ejemplo en el músculo rojo del salmón, formando HxR e Hx (Obatake y col., 1988, Kanoh y col., 1986) o bien un rápido incremento del valor K en las fibras rojas (Saito y col., 1959; Yada y col., 2000; Li y col., 2016).

Las diferencias intra e interespecíficas en la degradación de nucleótidos también están en función de la temperatura del hábitat, por ejemplo, en carpa, la tasa de incremento del valor K (medido a 32°C) es mayor cuando la carpa se aclimata a 10°C que a 30°C (Tsuchimoto y col., 1988a; Tsuchimoto y col., 1988b), o incluso debido a diferencias estacionales en condiciones similares de almacenamiento. Así, Grigorakis y col. (2003 y 2004) observan una mayor degradación en las primeras fases de deterioro de dorada salvaje y de cultivo en verano, donde ya se aprecia una diferencia de la cantidad total de ATP de esta especie.

La cantidad de ATP inicial depende del tipo de muerte según el tipo de pesca o recogida en especies de cultivo. Una muerte rápida produce cambios lentos en la degradación del ATP (Mochizuku y col., 1996), o técnicas como perforación del cerebro, anestesiado previo para reducir estrés generado durante su lucha en la captura (Erikson y col., 1997; Robb, 2001) son más eficientes en mantener el contenido inicial de ATP y reducir su degradación frente a la muerte en aire, o

hielo, con el consiguiente estrés (Kestin et al, 1995), aunque Huidobro y col. (2001) no encuentran diferencias durante el almacenamiento en hielo cuando la dorada se sacrifica con diferentes métodos. Métodos que retrasen la instauración del rigor se manifiestan en una degradación más tardía del ATP y sus correspondientes nucleótidos, incrementando la vida útil (Mochizuki y col., 1998; Erickson y col., 1999). En cualquier caso, la degradación de ATP en muchas especies es rápida hasta el IMP, que es el nucleótido que se almacena principalmente (Obatake y col., 1988). El paso a HxR e Hx dependerá de otros factores. Surette y col. (1988) indican que la acumulación rápido de IMP (incluso HxR) depende del trato postmortem y del mantenimiento de la integridad muscular, cuyo alteración mecánica favorece que los enzimas tengan más fácil acceso a otros reservorios de nucleótidos.

El eviscerado del pescado y posterior almacenamiento influye en la degradación del ATP, con una menor tasa de degradación en el caso de trucha de cultivo (Rodríguez y col., 1999) o mayor (Hattula y col., 1993), y en otros casos, no se han observado estas diferencias en la dorada (Huidobro y col., 2001). Y a mayor temperatura de almacenamiento, la degradación del ATP ocurrirá más rápido (Iwamoto y col., 1987; Hattula, 1997; Rodríguez y col., 1999).

Esta degradación de nucleótidos sólo se puede detener aplicando la congelación; los diferentes valores K o tasas de nucleótidos mostrados por diversos autores, son la explicación al trato del pescado previo al proceso de congelación. El ahumado en caliente favorece la degradación de los nucleótidos e incremento del valor K en periodos iniciales, pero luego se detiene por la desnaturalización térmica de las enzimas, no así el ahumado en frío, que sigue aumentando durante el periodo de comercialización (Hattula y Kiesvaara, 1996).

En MAP, los cambios del valor K difieren según las especies. En principio el tipo de atmósfera no afecta a la degradación del ATP o aumento del valor K (López Gálvez y col., 1998), aunque se observa un incremento de la vida útil del arenque y sardina frente al almacenado en aire o vacío (Ozogul y col., 2000, Ozogul y col., 2004), si bien, Reddy y col. (1997) no lo consideran adecuado al no corresponder con el análisis sensorial. Pero en general, para pescado

fresco y principalmente pescado de cultivo, el valor K se considera uno de los mejores indicadores de frescura, independientemente del año o época de captura (Hamada-Sato y col., 2005; Tejada y col., 2006, Tejada y col., 2007).

En el caso de *Solea* cultivada (Tejada y col., 2007), mantiene 2 lotes a diferente temperatura de aclimatación (22 mediterráneo 250 g, y 15°C Atlántico 320 g) antes del sacrificio, y almacenado en hielo a 2°C, observando diferentes respuesta de formación TBA (relacionado con la alimentación, más grasa a 22°C, 1,4%) y TMA (contenido inicial de OTMA diferente a causa de la alimentación, 4 veces más en 15°C, 16 mg N/100g), más alto a 15°C (a penas aumenta a 22°C) pero con pH más bajo. Sin embargo, el total de derivados del ATP ronda los 6 $\mu\text{mol/g}$ en ambos casos, y su degradación (Valor K) es similar, lineal, hasta el día 20 (valor K~30%), momento en que este parámetro aumenta en el lote estabulado a 15°C. El lote mediterráneo se rechaza sensorialmente a los 22 días en hielo (<30%), y el lote atlántico a los 25 días en hielo (42%). En estos casos, el valor K se halla por debajo del 40%, según los autores. El lote a 22°C va perdiendo catabolitos en el almacenamiento en hielo con respecto al lote a 15°C, debido a la lixiviación del hielo aunque es difícil explicar por qué este razonamiento no se aplica por igual en el otro lote almacenándose en idénticas condiciones. Curioso, el estabulado o criado en aguas más frías, dura más su vida útil pero con mayor contenido en TBA, TMA y Valor K; a pesar de ello, los autores indican que este último parámetro es el más “fiable”, lineal, independientemente del tamaño o composición.

Está ampliamente difundido que los nucleótidos influyen en el sabor y flavor del pescado. El IMP influye en el sabor dulce, un exaltador del flavor “*umami*” (Kuninaka y col., 1964, Matsumoto and Yamanaka, 1991). Al contrario de la Hx, que se asocia a sabores amargos (Jones and Murray, 1964; Hong y col., 2017) aunque hay autores que no asocian la Hx a cambios sensoriales (Spinelli, 1965).

En definitiva, se han desarrollado o propuesto diversos indicadores de frescura según especie, tal y como se representa en la Tabla 3, la mayoría como una relación entre los diversos catabolitos

de degradación del ATP, siendo el pionero Saito y col. (1959) con el Valor K.

Tabla 3. Indicadores de frescura basados en catabolitos del ATP para pescados y mariscos.

Indicador	Calculo	Especies	Referencia
Valor K	$\frac{(HxR+Hx) \times 100}{(ATP+ADP+AMP+IMP+HxR+Hx)}$	Varias especies marinas	Saito y col. (1959)
Valor K ₁ o K _i	$(HxR+Hx) \times 100 / (IMP+HxR+Hx)$	Dorada, Caballa	Karube y col. (1984)
Valor H	$(Hx) \times 100 / (IMP+HxR+Hx)$	Bacalao, salmónidos	Luong y col. (1992)
Valor P	$\frac{(HxR+Hx) \times 100}{(AMP+IMP+HxR+Hx)}$	Bacalao, caballa, cangrejo real	Burns y col. (1985)
Tasa IMP	$IMP \times 100 / (IMP+HxR+Hx)$	Atún	Gill y col. (1987)
Hipoxantina	Hx		Jones y col. (1964) Spinelli y col. (1964)

Desde entonces, las propuestas de frescura siguen siendo las mismas, si bien el método más ampliamente difundido entre los investigadores es el de CLAE de Ryder (1985), pero se incrementan los esfuerzos en mejorar las técnicas de detección y cuantificación de estos compuestos, buscando rapidez y buena identificación, sea por la clásica CLAE (Zur-Nedden y col., 2009; Mora y col., 2010; Logotheti y col., 2018), enzimas (Watanabe y col., 2005), mediante diversos sensores electroquímicos (Barat y col., 2008; Lawal y Adeloju, 2012; Itoh y col., 2013), pero con tendencia a aplicación de la técnica de electroforesis capilar como alternativa a la CLAE, que es

más rápida, requiere poco volumen de muestra en casos de estudio de células (Soga y col., 2007), pero limitado para el pescado por su pobre reproducibilidad, mayor límite de detección y mayor coste del equipo, comparado con el CLAE.

1.4.4. Otros métodos de frescura.

En general, los aparentemente imprescindibles métodos bioquímicos o microbiológicos para evaluar la inocuidad o aptitud del pescado son lentos y costosos. Los investigadores buscan alternativas a este fin, basados principalmente en características físicas, aunque en el fondo, todos estos procedimientos han de ser contrastados o calibrados con los métodos tradicionales para su validación.

Con la búsqueda de sistemas de aplicación directa sobre el pescado para evaluar su aptitud o calidad, de gran interés para la Industria, han surgido equipos como el *Torrymeter*, o *Fishtester*, en los que basan su valoración de frescura en función de la resistencia de las células a una corriente eléctrica de bajo voltaje, si bien existen problemas de interpretación dependientes de la especie, época de captura, días en hielo, forma de tomar la medida, etc, pero a pesar de ello, sigue siendo un equipo muy usado incluso a nivel industrial, a modo control interno (Jason y Lees, 1971; Burt y col., 1976; Pivarnik y col., 1990; Olafsdottir y col., 1997; Al-Jasser y Al-Jasass, 2014; Ochrem y col., 2014; Teklemariam y col., 2015; Hassoun y Karoui, 2017).

Desde entonces han surgido proyectos orientados a equipos basados en sensores químicos, que han derivado en equipos de laboratorio, y en pocos años se han especificado a sensores concretos como las lenguas y narices electrónicas (di Natale y Olafsdóttir, 2009), como el actual producto comercial *FoodSniffer* (Imagen 14), equipo de bolsillo pensado para comercializar a nivel doméstico. Sin embargo, sus valoraciones respecto a la calidad, en este caso el pescado, basado en un sensor para NH_3 , son cualitativos.



Imagen 14. Nariz electrónica manual para evaluar frescura de alimentos.

Desde hace apenas una década, se ha venido usando la tecnología NIR (espectroscopia infrarrojo cercano) para la determinación rápida de determinados compuestos químicos, principalmente compuestos nutricionales, de forma cuantitativa. De hecho, se comercializan equipos a escala laboratorio para medir estos compuestos elementales, como FOSS, mediante la modalidad de medida de transmisión. Sin embargo, este campo ha evolucionado hacia equipos sencillos basados en la medida de reflexión, lo cual aumenta las expectativas de uso incluso en la propia línea de procesado. Y no sólo para evaluar su composición, también como control de parásitos o de productos de alteración como se comenta a continuación (Nilsen y Heia, 2009).

Existen numerosas referencias científicas sobre aplicaciones espectroscópicas para el control de calidad y seguridad alimentaria del pescado, algunas de las más interesantes están recogidas en varios documentos de revisión como los de Cheng y col. (2013), o Cozzolino y col. (2012). El análisis del contenido graso ha sido uno de los objetivos más frecuentemente abordados en numerosas especies como salmón, atún, arenque, lubina, bacalao, o productos como *surimi*. Este parámetro se ha acompañado en ocasiones del desarrollo de calibraciones válidas para otros componentes mayoritarios como humedad, sal o proteína.

La evaluación del grado de deterioro del pescado mediante espectroscopía VIS-NIR también ha sido abordada en diferentes estudios, especialmente por investigadores noruegos del instituto NOFIMA. Un ejemplo serían las predicciones, con un error de un día,

acerca del tiempo de almacenamiento sobre hielo de bacalao y salmón o merluza (Heia y col., 2003). La utilización del espectro visible permitió a este mismo grupo (Sivertsen y col., 2011), demostrar la diferenciación entre bacalao fresco y descongelado.

La sustitución de las costosas técnicas de análisis de marcadores clásicos de frescura en pescado por sistemas basados en espectroscopía VIS-NIR también ha sido objeto de estudio. Pink y col. (1998) utilizaron un área espectral entre los 1530-1866 nm para correlacionar con los niveles de la dimetilamina que evalúan el tiempo de almacenamiento en congelación. Un estudio similar, igualmente en bacalao congelado, recogiendo espectros por reflectancia a través de la piel, Bechmann y Jorgenssen (1998) encontraron correlaciones con valores de otros parámetros de frescura (formaldehído, DMA, N BVT) o degradación del tejido (WHC) aunque con un grado de precisión que únicamente permitiría su utilización a modo de *screening*. Cambiando ligeramente la perspectiva, Nilsen y Esaessen (2005) emplearon la región del espectro visible de bacalao fresco para correlacionarla ($R > 0,9$) con un método estándar de valoración sensorial (QIM).

Las inferencias sobre niveles de desarrollo microbiano en pescado han sido más complejas. Lin y col. (2006) utilizaron una sonda de reflectancia en SW-NIR (600-1100 nm) sobre piel y músculo de trucha para capturar espectros y correlacionarlos con el desarrollo microbiano a través de las alteraciones que las bacterias causan en el tejido. En un estudio de vida útil forzado, los modelos desarrollados mostraron valores de predicción aceptables.

La versatilidad de la espectroscopía NIR ha permitido su aplicación para desarrollos más específicos en pescado. Los procesos industriales provocan alteraciones en las características del pescado que pueden ser objeto de detección con este tipo de metodologías. Por ejemplo, la evaluación de la magnitud del tratamiento térmico aplicado al pescado durante su transformación o durante la elaboración de *surimi* (Uddin y col., 2002; Uddin y col., 2006).

El concepto de imagen hiperespectral implica la integración de la información espacial para conformar un hipercubo de información en la que de cada pixel se puede extraer un espectro. Los espectros capturados en algunos de los estudios anteriormente citados se han

recogido con este tipo de sistemas aunque finalmente la variable espacial no haya sido relevante en muchos casos. Algunas revisiones bibliográficas como las de Liu y col. (2013), o Mathiassen y col. (2011), recogen numerosos trabajos acerca de aplicaciones de imagen hiperespectral en pescado.

En relación con el presente proyecto destacan los trabajos de Sivertsen y col. (2011) y en general los de todo el grupo de NOFIMA, para la detección de nematodos (*Anisakis*) en filetes de bacalao. Utilizando sistemas de ópticos de Norsk Elektro Optics AS en una disposición de retroiluminación de los filetes consiguieron detectar la presencia de estos parásitos. En la actualidad este grupo trabaja para la mejora de la capacidad de detección y velocidad de escaneo de este sistema que todavía no se encuentra en fase de comercialización. La mayoría de estos trabajos han sido desarrollados en entornos de laboratorio y con lotes de muestras seleccionados ad-hoc y simulaciones de procesos o de condiciones de conservación. Apenas se han encontrado estudios llevados a cabo en un entorno real de trabajo en la industria y con un bloque de muestras recogiendo la variabilidad natural existente.

La empresa nórdica TOMRA comercializa en la actualidad un conjunto de equipamientos que integran estos sistemas de análisis montados sobre una cinta transportadora, y que combinados a algoritmos de predicción que se han desarrollado para diversas aplicaciones, permiten la predicción de niveles de grasa, proteína y humedad en pescado en base a la información espectral recogida entre los 760-110 nm; al igual que el contenido de carne en buey de mar vivo, color, niveles de astaxantina y sal, detección de manchas de sangre, decoloraciones, etc... Esto ha sido posible gracias a una colaboración entre la empresa (TOMRA) e investigadores de NOFIMA (Wold y col., 2010; Segtnan y col., 2009). En la actualidad este grupo de investigación se encuentra desarrollando un sistema para poder detectar manchas de sangre en músculo de pescado previo fileteado.

A modo de resumen, se incluye en la Tabla 4. Posibilidades de las técnicas de imagen en función de la aplicación prevista (Mathiassen J.R. y col., 2011) el trabajo de Mathiassen y col. (2011),

donde se exponen las posibilidades de las técnicas de análisis en el desarrollo de aplicaciones en función del estado del arte actual.

Tabla 4. Posibilidades de las técnicas de imagen en función de la aplicación prevista (Mathiassen J.R. y col., 2011)

Inspected property	Online imaging technologies				X-Ray Imaging (CT)		Magnetic Resonance Imaging	
	VIS/NIR imaging		VIS/NIR imaging spectroscopy		X-Ray Imaging			
	Capable	Best Mode	Capable	Best Mode			Capable	Best Mode
Color	Yes	Diffuse Reflectance	Yes	Interactance	—	—	—	—
Fat	Limited ^a	Diffuse Reflectance	Yes	Interactance	—	Yes	Yes	1H
Protein	—	—	—	—	—	Yes	—	—
Water	—	—	Yes	Interactance	—	Yes	Yes	1H
Salt	—	—	Yes	Interactance	—	Yes	Yes	23Na
Freshness	—	—	Yes	Interactance	—	—	Yes	1H
Weight	Yes	3D	—	—	Yes	—	—	—
Internal anatomy	Limited ^b	Transmittance	Limited ^c	Transmittance	Limited ^d	Yes	Yes	1H
External anatomy	Yes	Interactance/3D	Limited ^d	—	Limited ^d	Yes	Yes	1H

^a Limited to fat prediction from myoseptes area in salmonid cutlets and fillets.

^b Limited to anatomy observable in the imaging plane, and only in transmissive objects. For non-transmissive objects, the position of internal anatomical features can in some cases be predicted from external anatomy.

^c Limited to anatomy observable in the imaging plane, and only in transmissive objects.

^d Limited to anatomy observable in the imaging plane.

En definitiva, para poder utilizar esta aparentemente útil metodología basada en espectroscopía VIS/NIR, primero es necesario establecer unas determinantes conclusiones analíticas por procedimientos tradicionales, para poder validar estos métodos de control rápido a nivel Industria.

1.5. APLICACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE FRESCURA A CONSERVAS.

Las conservas, debido al tratamiento térmico al que son sometidas, presentan algunas dificultades para la aplicación e interpretación de algunos de los parámetros de frescura antes descritos. Además, los estudios orientados a determinar el grado de frescura de la materia prima usada para la elaboración de conservas de pescado son escasos, o poco concluyentes. Suelen orientarse a meros controles sanitarios, buscando supervivencia de microorganismos, o presencia de compuestos tóxicos regulados por la legislación, por ejemplo, la histamina.

Se han estudiado por diversos autores, lo qué ocurre con los compuestos de naturaleza nitrogenada volátil: BVT, OTMA, TMA; DMA, NNP y NH₃ (Iida y col., 1982; Gallardo y col., 1990; Wootton

y col., 1989; Besteiro y col., 1993). Respecto a las aminas no volátiles, se han llegado a proponer algunos indicadores concretos, pero para determinadas especies, y según qué condiciones: histamina como amina más frecuente (Tokunaga y col., 1982; Ababouch y col., 1989; Veciana y col., 1989; Wootton y col., 1989, Rodríguez y col., 1996), Tiramina (Veciana y col., 1989), putrescina y cadaverina (Wootton y col., 1989). Pero en la mayor parte de los casos, y en estos últimos años, los trabajos realizan un control en base a la presencia de aminas en general, en diferentes muestras de conservas (Rabie y col., 2014; Bilgin y Gencelep, 2015; Evangelista y col., 2016; Prester, 2016; Parchami y col., 2017; Barbosa y col., 2017). De estos datos se observa que los productos de la pesca en conserva con mayor tasa de aminas (y centrándose muchos en la histamina) son elaboraciones de aquellos países fuera del ámbito europeo y norteamericano, principalmente.

Otros estudios van dirigidos a estudiar los productos derivados de la degradación lipídica: TBA (Taguchi y col., 1982a; Taguchi y col., 1982b), carbonilos (Tokunaga y col., 1982) y etanol (Iida y col., 1982, Tokunaga y col., 1982), así como los 5'-nucleótidos derivados del ATP (Gallardo, 1978, Iida y col., 1982; Tokunaga y col., 1982; Rodríguez y col., 1996; Vázquez-Ortiz y col., 1997), pero con resultados poco concluyentes.

En esta última década destacan los estudios relacionados con compuestos de naturaleza tóxica, sean de origen natural (como la presencia de metales pesados), como procedentes del envase, caso del bisfenol-A o BADGE, entre otros (Cunha y col., 2012), y para identificar especies pesqueras para evitar fraudes (Espiñeira y col., 2009).

En resumen, las conclusiones son muy diversas incluso para un mismo compuesto, o meramente descriptivas. No cabe duda alguna en que el producto de alteración más estudiado en conservas es la presencia de Histamina, como se comentó, por sus efectos sobre la salud humana (Biji y col., 2016). Suelen ser estudios de mercado, para valorar la salubridad de estos productos, y muy raras veces se suele hacer un proceso de elaboración de conservas controlado para entender su presencia.

Por tanto, es importante controlar primeramente la naturaleza química de la materia prima, controlar las diferentes etapas del proceso, y así poder entender lo que ha ocurrido en el producto final.





OBJETIVOS





2. OBJETIVOS

El planteamiento de este trabajo parte de la idea de conocer el grado de deterioro de especies pelágicas de interés comercial y de interés al mismo tiempo para las empresas transformadoras de conservas, empresas importantes en la base socio-económica gallega. Se desea evaluar este grado de deterioro con su grado de frescura, correlacionando las características sensoriales del pescado fresco con los parámetros químicos resultantes de la degradación enzimática y microbiana del músculo.

La elección de la sardina (*Sardina pilchardus*, Walb.) como una de las especies objetivo es porque por un lado nos permite disponer de la misma todo el año, se puede disponer de gran número de ejemplares para tratamientos de muestras y fáciles de elaborar debido a su tamaño pequeño. Así mismo, es una de las principales especies de peces destinadas a la elaboración de conservas, tras el atún y el mejillón. Dada su baja tasa de capturas en estas últimas décadas en el stock del Atlántico-Cantábrico, ha pasado a ser un artículo de lujo, del que poco se sabe a nivel bioquímico a pesar de su popularidad, y que al poder conocer todas las variables que tienen lugar tras su captura hasta la elaboración del producto terminado, la interpretación de los resultados obtenidos cabe sean más fáciles de comprender. Es por otro lado una especie grasa, con un periodo de vida útil muy corto, por lo que es interesante el reto de conseguir incrementar el periodo de conservación aplicando tecnologías alternativas al proceso tradicional (conservación en hielo).

El objetivo principal de este trabajo es hallar algún parámetro químico que indique el grado de frescura del pescado pelágico tanto en producto fresco como en su correspondiente producto en conserva, cuyo uso sea complementario al análisis sensorial y que agilicen los análisis de idoneidad del pescado.

A continuación se exponen los objetivos concretos que se pretenden conseguir con la realización de este trabajo:

- a) Evaluar la eficacia del empleo de un sistema de refrigeración a bordo, sencillo, Agua de Mar Enfriada, para especies pelágicas.
- b) Evaluar la eficacia del uso de Atmósferas Protectoras en el incremento de la vida útil de la sardina durante su almacenamiento como producto fresco, en condiciones de refrigeración.
- c) Conocer los cambios bioquímicos a lo largo del ciclo vital de la sardina (caracterización) y en diferentes intervalos de tiempo.
- d) Conocer los diferentes cambios físico-químicos que tienen lugar durante el proceso de conservas y determinar la posible utilidad de los diferentes parámetros físico-químicos como indicadores del grado de frescura de la materia prima utilizada en el caso de conservas de sardina.
- e) Evaluar el valor de letalidad (F_0) mínimo que garantice la destrucción de *Clostridium botulinum* en conservas de sardina en aceite, formato RR-125.

MATERIALES Y METODOS





3. MATERIALES Y METODOS

3.1. MATERIA PRIMA.

Se utilizó **sardina** (*Sardina pilchardus*) y **jurel** (*Trachurus trachurus*) capturados con arte de cerco por la flota de bajura del puerto de Portosín, frente a las costas gallegas (arco Atlántico-Artabro).

Para evaluar la efectividad y viabilidad del empleo del Agua de Mar Enfriada (AME) a bordo de los barcos de pesca se utilizó jurel, capturado durante el mes de Abril de 1997. El hecho de realizar estas pruebas con jurel y no con sardina fue debido a que durante tres días de pesca, los bancos de sardina permanecían fuera del radio de acción de los cerqueros, capturando sólo jurel, por lo que se optó por realizar las pruebas con esta especie.

El estudio de vida útil del pescado con envasado en Atmósferas Protectoras (EAP o MAP) se realizó con muestras de sardina. Debido al volumen de muestras planificado, la logística y el tipo de análisis a desarrollar, se realizaron varios experimentos en un periodo comprendido entre mayo de 1992 y 1994, procurando que las muestras tuviesen una cantidad de grasa corporal superior al 10%, y siempre partiendo de cantidades de sardina en torno a los 25 kg, en cajas de PP, por experimento. Se contempla un máximo de 4 lotes por experimento. Se realiza además un seguimiento mensual para su caracterización bioquímica en este periodo, contrastando con un análisis durante 2016.

Para la primera experiencia de elaboración de conservas, donde se estudió la alteración bioquímica de la sardina y su comportamiento durante la esterilización, ésta se capturó en Junio del 1995.

En la segunda experiencia con conservas, encaminada al estudio del comportamiento y formación de los componentes químicos de la sardina, empleando diferentes tiempos y temperaturas de esterilización, las muestras se capturaron en Febrero de 1995.

En todos los casos, los ejemplares se mantuvieron en cajas de plástico con hielo hasta su llegada a puerto. Posteriormente, se transportaron en una furgoneta isoterma (5-6°C) hasta el laboratorio en cajas de PP con hielo en proporción 4:1 (pescado:hielo), almacenándose las muestras en una cámara refrigerada (+4°C) hasta el desarrollo de los ensayos.

Para el tercer experimento de elaboración de conservas, se recogieron al azar conservas de *sardina en aceite vegetal* de diferentes marcas comerciales, tomadas en distintas superficies comerciales de alimentación del área de Santiago.



3.2. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS INSTRUMENTALES.



- **Equipo instrumental**

- Sistema HPLC Waters
- Bomba cuaternaria 600 controller
- Automuestrador 717plus
- Detector fluorescencia 470
- Sistema HPLC Merck-Hitachi
- Bomba ternaria L-6200A
- Detector UV-VIS L-4200, longitud de onda variable
- Espectrofotómetro Diode-Array UV-VIS Hewlett Packard 8452A
- Baño termostático SELECTA Unitronic 320 OR
- Estufa SELECTA Digitronic
- Centrífuga de mesa SELECTA, 1000 rpm
- Centrífuga de mesa refrigerada HERMLE Z 323 K, 14500 rpm
- Agitador de tubos SCHOT SG 23
- Agitador magnético múltiple SBS A-13 serie D
- pHmetro CRISON microPH 2002
- Placa calefactora SELECTA Recisplac
- Batería de placas calefactoras SELECTA

- Mufla Thermolyne 1400 Furnace

- Balanza analítica Mettler PE 200
- Balanza analítica Mettler H72
- Homogeneizador KINEMATICA AG Polytron
- Bomba de vacío GAST
- Cerradora manual de latas SOMME
- Autoclave RAYPA
- Termómetro de campo con sonda de penetración CRISON 638Pt
- Sondas térmicas EBRO e iButton
- Conductivímetro de campo WTW
- Congelador Whirlpool
- Congelador Nortline
- Destilador semimicro-Kjendhal AFORA
- Manta calefactora AFORA

- **Reactivos**

- Acetato de sodio PANREAC PA
- Acetonitrilo BDH HPLC
- Acido 2-tiobarbitúrico Aldrich
- Acido acético glacial PANREAC PA

- Acido bórico PANREAC PA
- Acido clorhídrico PANREAC PA
- Acido perclórico PANREAC PA
- Acido picrico PANREAC PA
- Acido sulfúrico PANREAC PA
- Acido tricloroacético PANREAC PA
- Agmatina Sigma
- Agua MilliQ[®]
- Agua MilliRO[®]
- Alcohol etílico PANREAC PA PA
- Alcohol metílico HPLC
- Alcohol metílico PANREAC PA
- BHT Aldrich
- Catalizador Se-Cu PANREAC
- Columna HPLC Nova-Pack[®] C18 60Å 4µm 3,9x150 mm
- Columna HPLC KROMASIL[®] 100 C18 5µm 25x0,46 cm
- PIC nucleótidos
- PIC aminas
- Espermidina Sigma
- Espermina Sigma
- Formaldehido PANREAC PA
- Hidróxido de potasio PANREAC PA
- Hidróxido de sodio PANREAC PA
- Hipoxantina Sigma
- Histamina Merck
- Indicador mixto para NH₃ PANREAC
- Mercaptoetanol Merck
- BRIJ[®]
- o-phthalaldehido Merck
- Oxido de magnesio PANREAC PA
- Oxido de Trimetilamina Sigma
- Potasio di-hidrógeno fosfato PANREAC PA
- Potasio hidrógeno fosfato PANREAC PA
- Putrescina Sigma
- Silicona antiespumante PANREAC
- Silicona para esmerilados PANREAC
- TEP Sigma
- Tolueno PANREAC PA
- Triclorometano PANREAC PA
- Tricloruro de titanio Sigma
- Trimetilamina clorhidrato Sigma

- **Material**

- Abrelatas
- Adaptadores de caucho, varias medidas
- Bandejas PVC 2 l
- Bisturí
- Cajas pescado 10 l
- Crisoles de porcelana 30 ml
- Cubetas plástico PP
- Cubeta de cuarzo espectrofotómetro Hewlett-Packard
- Cuchillos
- Embudos de cristal rama corta
- Escalpelos
- Espátulas metálicas
- Filtros HV Millipore 0,45 μm , 47 mm \varnothing
- Filtros HV Millipore 0,45 μm , 13 mm \varnothing
- Filtros Papelera del Besós, S.A. 442
- Gradillas metal
- Gradillas plástico
- Imanes con teflón, varias medidas
- Jeringa Hamilton HPLC 2ml
- Lancetas

- Matraces aforados AFORA tipo A de 5, 10, 50, 100, 500 y 1000 ml
- Matraces aforados AFORA tipo B de 5, 10, 25, 50, 100, 500 y 1000 ml
- Matraz Erlenmeyer 250 y 500 ml AFORA
- Matraz Kitasatos 250 y 500 ml SIMAX
- Microburetas 2 ml AFORA
- Neveras portátiles 36 l
- Papel de filtro Albet 150 420x520 mm
- Pesasustancias AFORA 5, 10 y 30 ml
- Pipetas aforadas AFORA tipo A de 1, 2, 3, 5 y 10ml
- Pipetas aforadas AFORA tipo B de 5, 10, 25 y 50ml
- Pipetas graduadas AFORA 1, 2, 5 y 10 ml
- Placas Petri AFORA 100 mm \varnothing
- Portafiltros Millipore Swinnex plástico
- Probetas AFORA 50, 100, 250 y 1000 ml
- Sistema filtración de disolventes AFORA 1 l
- Tijeras
- Tubos centrífuga 30 ml COREX

- Tubos centrífuga plástico 50 ml
- Tubos de centrífuga de vidrio 10 ml SIMAX
- Tubos PYREX 15x150 mm con tapón de rosca
- Varillas de vidrio
- Vasos precipitados SIMAX 50, 250, 500 y 1000 ml
- Sal marina iodada

- **Material fungible alimentario**

- Envases de hojalata RO-200 abrefácil de un cuerpo y una tapa, con barniz interno epoxifenólico.
- Envases de hojalata RR-125 abrefácil de un cuerpo y una tapa, con barniz interno epoxifenólico.
- Tarrinas de plástico termosellables PP/EVOH/PP
- Film para sellado de PP/PA biorientada de Plásticos Arias
- Balas de gases alimentarios de Carburos Metálicos:
 - EAP50
 - EAP60
 - EAP20
 - 5:75:20 (O₂/CO₂/N₂)
 - 100% N₂
 - 100% CO₂
- Aceite de girasol KOIPE

3.3. METODOLOGÍA ANALÍTICA

3.3.A. Métodos Biométricos

3.3.A.1. Longitud de las piezas.

Los ejemplares de las especies a estudio se han medido con un “ictiómetro” de PP, tomando la longitud que va desde la boca hasta el nacimiento de la aleta caudal (Imagen 15).



Imagen 15. Medida de longitud de *Sardina pilchardus* en ictiómetro.

3.3.A.2. Peso de las piezas.

La tara se realizó con una balanza granataria Mettler PE 200 sobre ejemplares enteros, con una precisión de 0,01 g.

3.3.A.3. Longitud de la gónada.

Tras la evisceración de los ejemplares, se retiraba la gónada y se extendía sobre papel secante. Se midió la longitud máxima de la gónada extraída, siempre que lo permitió el estado de madurez gonadal.

3.3.A.4. Determinación del sexo estado gonadal.

Se observó la presencia de huevos en diferentes estados de madurez en las hembras y el grado de madurez en las gónadas de machos por el color y aspecto (Pascual y col., 1984).

3.3.B. Análisis Físicoquímicos

3.3.B.1. Análisis de la composición elemental.

Para la realización de los diferentes análisis, a los ejemplares se les retiraban suavemente las escamas con un escalpelo en sentido postero-anterior, preparando los filetes con piel, libres de la espina dorsal y las espinas abdominales. Se prepararon 5 muestras, cada una constituida por los filetes de 3 a 5 sardinas. Cada muestra se picaba y homogeneizaba con una picadora *Moulinex*.

3.3.B.1.1. Humedad.

Se determinó sobre muestras de 10 g de músculo picado sobre una placa Petri, desecando el músculo en una estufa a +105°C, hasta peso constante, siguiendo el procedimiento 4.1.06 descrito por la AOAC (1995).

3.3.B.1.2. Cenizas.

La determinación fue realizada sobre muestras de 5 g de pescado en crisoles de porcelana de 30 ml, calcinadas a una temperatura de 550-560°C durante 24 horas (método 4.1.10, AOAC, 1995).

3.3.B.1.3. Grasa.

Se pesaron en torno a 10 g de músculo de pescado picado, según el método desarrollado por Blight y Dyer (1959). Se aplica una mezcla de cloroformo y metanol-agua a la muestra y se homogeniza, disolviendo la grasa en la fase orgánica. A partir de ésta y tras la evaporación del solvente a 65 °C, calculamos el peso de la grasa contenido en la alicuota.

3.3.B.1.4. Proteínas.

Según el método 4.2.09 AOAC (1995). La digestión de la muestra se realizó con ácido sulfúrico en presencia de catalizador Kjeldhal (Cu-Se) en una batería calefactora. La destilación se realizó en un destilador semimicro Kjeldhal. El destilado se recogió en 10 ml de ácido bórico 4 % con indicador mixto PANREAC neutralizado. El

contenido en nitrógeno se valoró con una disolución de ácido clorhídrico 0,1 N.

3.3.B.1.5. Perfil de Acidos Grasos.

De una alícuota obtenida para la evaluación del contenido graso, se generan metilésteres mediante BF_3 (AOAC, 2000), separación en columna capilar INNOWAX Agilent, identificación y cuantificación mediante espectrometría de masas, empleando para la recta patrón, la mezcla de 37 componentes de SUPELCO ref.47885-U.



3.3.B.2. Parámetros de alteración.

Preparación de extractos:

Para la determinación de los parámetros de alteración se han realizado dos tipos de extractos: en ácido tricloroacético al 5 % (p/v), y en ácido perclórico 0,6 N (v/v), ambos en agua desionizada MilliQ®. Para la realización de los diferentes extractos, a los ejemplares se les retiraban suavemente las escamas con un escalpelo en sentido postero-anterior, preparando los filetes con piel libres de la espina dorsal y las espinas abdominales. Se prepararon 5 muestras, cada una constituida por los filetes de 3 a 5 sardinas. Cada muestra se picaba y homogeneizaba con una picadora Moulinex.

I - Ácido tricloroacético. Se pesaron 10 gramos de muestra previamente picada y se homogeneizaron con 25 ml de ácido tricloroacético en un Polytron (Kinemática AG) a 7000 rpm durante 1 minuto hasta su total homogeneización. A continuación, se centrifugó a 5000 rpm a 0 °C durante cinco minutos. El sobrenadante se filtró con papel cualitativo de celulosa núm. 442 (Papelera del Besós S.A.) en un matraz aforado de 50 ml; se volvió a resuspender el precipitado con 20 ml de ácido tricloroacético y se centrifugó en las mismas condiciones. El sobrenadante se volvió a filtrar. Una vez concluido el filtrado, cada extracto se llevó a un volumen final de 50 ml con ácido tricloroacético y se congeló el extracto a -24 °C para su posterior análisis.

Este extracto se utilizó para los análisis de OTMA, DMA y TMA.

II - Ácido perclórico. Se pesaron 10 g de muestra previamente triturada a la cuál se le añadió 25 ml de ácido perclórico 0,6 N frío (0-2°C) con un 2% de BHT 0,15 % en etanol. Se homogeneizó la muestra en un Polytron (Kinemática AG) a 7000 rpm durante 1 minuto hasta su total homogeneización. Posteriormente, se centrifugó a 5000 rpm durante cinco minutos a 0°C y el sobrenadante se filtró a través de un papel cualitativo de celulosa núm. 442 (Papelera del Besós S.A.) en un matraz aforado de 50 ml. El precipitado se resuspendió con 20 ml de ácido perclórico frío y se procedió a una nueva centrifugación en las mismas condiciones. El sobrenadante fue

filtrado de nuevo y se enrasó el contenido del matraz a 50 ml con ácido perclórico.

El extracto fue congelado a -24 °C para el posterior análisis de BVT y aminas no volátiles. Una alícuota del extracto fue utilizado para el análisis de TBA, en el mismo día.

III - Extracto para análisis del ATP y sus catabolitos. Se recogieron 10 ml de extracto de ácido perclórico 0,6 N y se neutralizaron con KOH (30 % en agua desionizada MilliQ[®]) hasta alcanzar un pH comprendido entre 6,5-7. El neutralizado se centrifuga durante 5 minutos a 5000 rpm y a 0°C para precipitar el perclorato potásico. El sobrenadante se filtra en papel de filtro de celulosa (papel núm. 442, Papelera del Besós S.A.). El precipitado se resuspende con 10 ml de tampón fosfato 0,1 M (pH 7) y se vuelve a centrifugar repitiendo el proceso. El filtrado se lleva a un volumen final de 25 ml con tampón fosfato 0,1 M. Una alícuota de éste extracto se congela a -24°C hasta su posterior análisis por CLAE.

3.3.B.2.1. Bases volátiles totales (BVT).

Se aplicó el método desarrollado por Antonacopoulos y Vyncke (1989). Tras la agregación de óxido de magnesio, se separan del extracto ácido las bases volátiles nitrogenadas mediante destilación por corriente de vapor de agua y se recogen sobre un colector con ácido bórico 4% e indicador mixto, titulándose seguidamente con ácido ClH 0,1 N.

3.3.B.2.2. Oxido de trimetilamina (OTMA).

Se realizó según el método descrito por Parkin y Hultin (1982). Para ello se añade tricloruro de titanio 0,15% a una alícuota de extracto ácido para reducir el OTMA a TMA en un baño maría (60°C, 10 min). Para la determinación de TMA así obtenida, se aplica el mismo método que se desarrolla para la TMA.

3.3.B.2.3. Trimetilamina (TMA).

Siguiendo el método original de Dyer (1959) modificado por Castell y col. (1974). Este implica la extracción de bases volátiles con

ácido Tricloroacético (TCA). Las bases diferentes a TMA se acomplexan con Formaldehído (20%). Se utiliza tolueno para retener la TMA tras basificar el extracto ácido y se hace reaccionar con ácido pícrico para obtener una sal coloreada de picrato. Esta es analizada espectrofotométricamente a 410 nm, y el resultado obtenido mediante recta patrón.

3.3.B.2.4. Sustancias reactivas con el Acido 2-tiobarbitúrico (TBA).

Se siguió la técnica descrita por Witte y col. (1970), en la modificación de Pikul y col. (1989). El método se basa en la extracción del Malondialdehído (MDA) en medio ácido (PCA); formación del complejo coloreado (rosa) MDA-TBA y determinación de este compuesto por absorbancia a 532 nm, en base a una recta patrón. El valor de la absorbancia nos dará un valor del grado de oxidación de los lípidos.

3.3.B.2.5. Aminas no volátiles (aminas biógenas).

Se aplica el método CLAE desarrollado por Veciana y col. (1995). Se han determinado las siguientes aminas (Imagen 16): putrescina (PUT), tiramina (TYR), cadaverina (CAD), agmatina (AGM), histamina (HIS), serotonina (SER), β -feniletilamina (PHE), triptamina (TRP), espermidina (SPN) y espermina (SPA), usando la cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE). El método se basa en la separación cromatográfica por pares iónicos en una columna de fase reversa C₁₈ incluyendo una reacción derivatización post-columna con *o*-phthalaldehído, para formar derivados de aminas fluorescentes.

En las siguientes imágenes se exponen los cromatogramas correspondientes a un patrón de 2 ppm (Imagen 16) y 8 ppm (Imagen 17) de las 10 aminas estudiadas. Tras la histamina, el pico que se observa a 32 min corresponde al patrón interno utilizado.

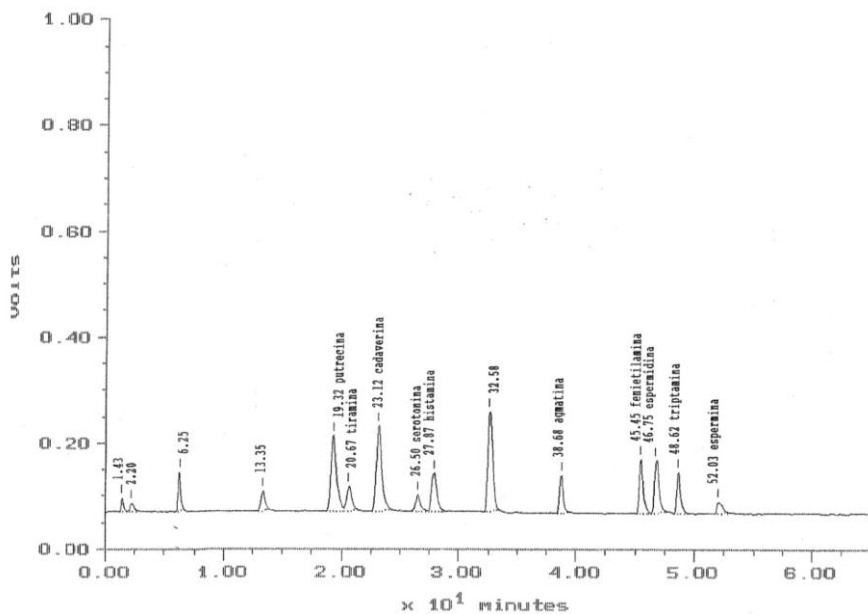


Imagen 16. Cromatograma de un patrón de 2 ppm de aminas biógenas.

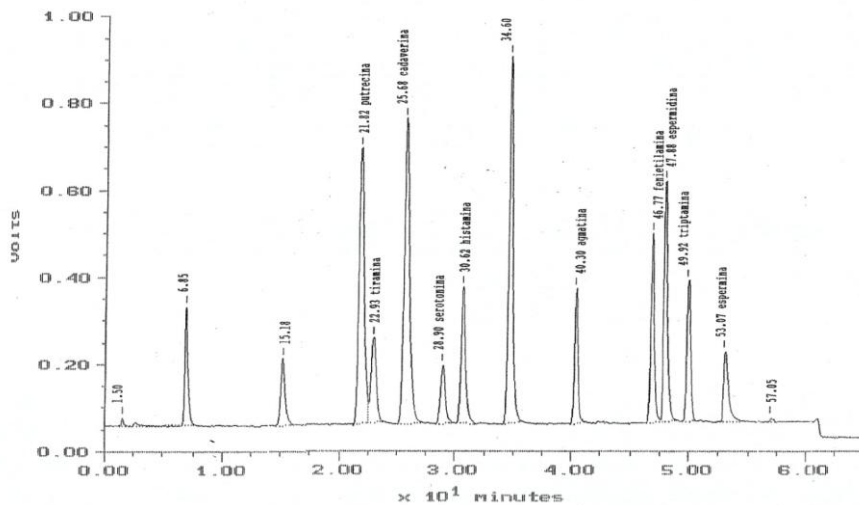


Imagen 17. Cromatograma de un patrón de 8 ppm de aminas biógenas.

3.3.B.2.6. Catabolitos del ATP: 5'-nucleótidos y purinas.

Según el método desarrollado por Murray y Thomsom (1983), por CLAE, modificado por Veciana-Nogues y col. (1997b), que proponen el empleo del par iónico (tetrabutilamonio hidrógeno sulfato) en método de gradiente para evaluar las purinas y nucleótidos de degradación del ATP para pescado fresco y en conserva, en este caso *Thunnus albacares*, ya que así se evita la aparición de un compuesto desconocido en pescado en conserva que interfiere con el tiempo de retención del ATP cuando no se usa el par iónico. Así mismo, los patrones y extractos de muestras son estables en congelación (-18°C) durante al menos 26 semanas. Se detectan y cuantifican *adenosín 5'-trifosfato* (ATP), *adenosín 5'-difosfato* (ADP), *adenosín 5'-monofosfato* (AMP), *ácido inosínico* (IMP), *inosina* (HxR) e *hipoxantina* (Hx). Los nucleótidos y purinas se separan en un tampón neutralizado (pH 7) en una columna de fase reversa (*Spherisorb ODS2* 25x0,46 cm). Su detección es en la franja UV a 254 nm. Rodríguez y col. (1997) proponen una modificación. Comenzamos trabajando en condiciones de gradiente, con 100% de tampón fosfato 0.1M, añadiendo un 10% de metanol desde el minuto 5 hasta el 13 para conseguir la elución de los 5'-nucleótidos más polares. La justificación de dicha modificación es la existencia de un compuesto desconocido que por el método original se solapa con la hipoxantina; al fluir sólo tampón se consigue dicha separación aunque se retrasa unos minutos la elución de la hipoxantina. Este método analítico se empleo para la determinación de los catabolitos del ATP en los ensayos realizados con sardina, pero para mejorar el método analítico (Imagen 18) por la presencia del pico que solapaba la posición de la hipoxantina (Rodríguez y col., 1997), se emplea una columna con relleno *Kromasil* 100 C18, 25x0,4 cm y partícula de 5 µm, aplicando el siguiente programa de elución:

Tiempo (min)	Fase A	Fase B
0	100	0
5	95	5
5,5	90	10
18	90	10
18,5	100	0
25	100	0

Fase A: tampón fosfato 0,1 M+0,66 g de Tetrabutilamonio hidrógeno sulfato; Fase B: metanol. Flujo de la fase móvil: 1,5 ml/min.

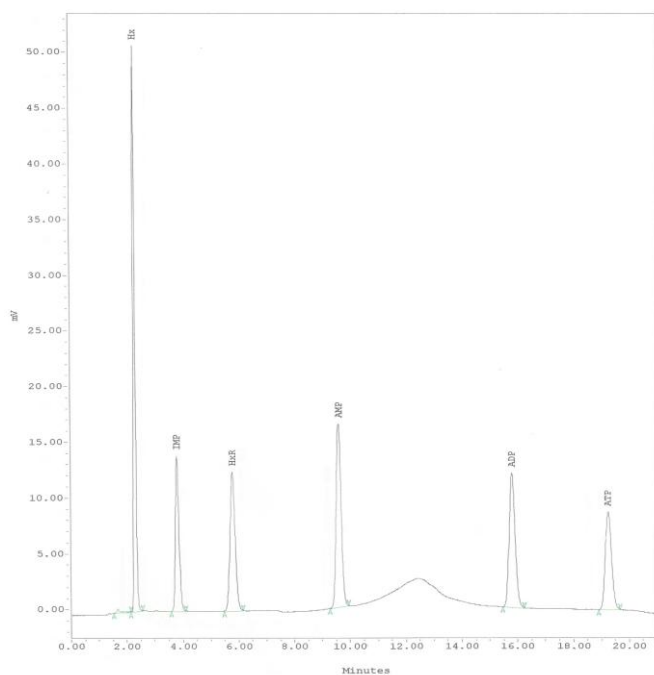


Imagen 18. Cromatograma de un patrón de 10 ppm de purinas y 5'-nucleótidos derivados del ATP, a excepción de la Hx (20 ppm).

3.3.C. Análisis microbiológico.

Se adquiere *C. botulinum* tipo E, cepa CECT 4611, del CECT de la Universidad de Valencia. Para la preparación de los inóculos de *C. botulinum* se siguieron las instrucciones de manejo de cepas especificadas por la CECT: “*Growth conditions for CECT strains*” y “*Handling and cultivation of anaerobe*”, y las indicaciones establecidas en la ISO 11133: 2014 “*Preparación, producción conservación y ensayos de rendimiento de los medios de cultivo*” apartado 5.4 “Microorganismos para las pruebas de rendimiento”.

Los métodos de ensayo BMTNA050 “Recuento esporos anaerobios mesófilos” y PEE/2/60 “Detección y recuento de anaerobios sulfito-reductores a +37°C” están basados en ISO 15213:2003 “*Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions*”.

Al mismo tiempo, se realiza en materia prima, un control microbiológico estándar:

- Detección y recuento de anaerobios sulfito-reductores a +37°C, recuento en placa.
- Detección y recuento de microorganismos aerobios a +30°C, recuento en placa.
- Recuento de *Enterobacterias*, método NMP.
- Investigación de *Salmonella spp* por Inmunofluorescencia (presencia/ausencia).
- Investigación de *Listeria monocytogenes* por Inmunofluorescencia (presencia/ausencia).

3.3.D. Análisis organoléptico.

Se han empleado diferentes escalas graduadas de valoración sensorial según la especie y/o producto a estudio.

SARDINA: Para elaborar los descriptores sensoriales se sigue la estructura diseñada por Shewan y col. (1953) para bacalao en hielo y de acuerdo a las normas UNE (AENOR, 2010), que en este caso se definen las características de cada atributo a evaluar en la sardina, desde su máxima frescura (que coincide con la máxima puntuación) hasta que alcanza sobradamente claros signos de alteración o putrefacción, tabla sensorial que ya fue definida por Rodríguez y col. (1991) con 10 puntos. La valoración en este caso se sintetiza a 4 puntos, aplicando una fórmula que tienen en cuenta los datos externos en fresco, tal y como se describe en los baremos sensoriales establecidos por la UE (Botta, 1995), de acuerdo al sistema de análisis descriptivo (QDA) descrito por Stone and Sidel (2004), y ya aplicado previamente en el caso de *Engraulis encrasicolus* por Besteiro y col. (2000), y también contemplan la valoración en cocido, asignando a cada grupo de atributos un factor de importancia, cuyo valor medio global se designa como Valor Q (Rodríguez y col., 1991).

Dado que el pescado envasado en Atmósferas Protectoras (MAP) carece de muchas de las estructuras anatómicas del pescado que se conserva de forma tradicional, referencia, se elabora otro cálculo del Valor Q donde sólo se consideran los atributos en común de los diferentes lotes a evaluar (Valor Q cocido).

Durante la última década, en el análisis organoléptico del pescado se ha puesto en boga el uso del Valor QIM (*Quality Index Method*), similar al anterior, sólo que en este caso la puntuación que se asigna a un atributo con un máximo de frescura se corresponde con 0, y a medida que se va alterando, la puntuación aumenta hasta un máximo de 3 a 5 puntos, según el atributo a evaluar, por tanto no es equitativa la puntuación a cada atributo. Con el sistema QIM no existen valores medios, simplemente se incrementa el número de puntos en total del pescado acorde con su alteración, pero es difícil establecer un límite de aptitud dado que en ocasiones, por las condiciones físicas de almacenamiento, puntualmente la piel o el ojo pueden parecer

corresponder sus características a condiciones de alteración, lo cual devalúa la frescura final, aunque la parte comestible del pescado tenga sus cualidades perfectamente aptas para su consumo, tanto sensorialmente (en cocido) como en valoración química y microbiológica. Este sistema aumenta el número de criterios (o atributos) a evaluar y reduce el número de grados (o puntos) para cada criterio.

Por ello, consideramos adecuado no contemplar sólo las cualidades externas en fresco, sino también las pruebas en cocido, que en el fondo es lo que el consumidor percibirá cuando el pescado se prepare para el consumo, al tiempo que al considerar más atributos y aplicar un valor medio simplifica la interpretación objetiva de la frescura del pescado. El sistema QIM es un método simple y rápido, especialmente de interés a nivel industrial, originalmente desarrollado por el *Tasmanian Food Research* (Bremner, 1985), donde también es preciso definir unos esquemas de referencia para cada especie de pescado, para una misma especie según el tipo de conservación aplicado (MAP, *superchilling*, hielo, vacío, salado) y para cada producto pesquero transformado de la misma (cocido, conserva), y donde la puntuación 0 siempre corresponderá a un pescado muy fresco sin ningún tipo de alteración (Campus y col., 2011).

Martinsdottir y col. (2001) elaboraron una lista de diferentes esquemas de referencia para 11 especies comerciales. Barbosa y Vaz-Pires (2004) recopilan los diferentes esquemas QIM desarrollados hasta la fecha para diversas especies. Entre las últimas especies almacenadas en hielo con esquemas QIM similares a la sardina se halla la anchoa argentina *Engraulis anchoita* (Massa y col., 2012), quien sugiere un límite de aptitud sensorial de 7 días (excesivo a nuestro criterio, más cuando es una especie más delicada que la sardina, Besteiro y col., 1996) y la boga *Boops boops* (Bogdanovic y col., 2012), las cuales aplican puntuaciones de 0-2 o 0-3 puntos según el parámetro a evaluar, aunque a nuestro criterio deberían tener la misma cantidad de puntos. Por otro lado, la correlación entre análisis sensorial y diferentes parámetros (químicos, tiempo) no muestran diferencias significativas entre el sistema QIM y el sistema de Torry (institución escocesa), similar al propuesto por en esta tesis, con la

única ventaja para el QIM de ser más rápido (Bogdanovic y col., 2012).

En cualquier caso, se realiza un entrenamiento de un panel de cata (hasta 7 jueces o catadores), a partir de ejemplares de sardina que se dejan deteriorar en el tiempo en condiciones de refrigeración. El panel de cata describe las sensaciones que percibe en la siguiente tabla (Tabla 5), de acuerdo a las Normas UNE (AENOR, 2010), fortaleciendo aquellos parámetros o atributos que son más difíciles de interpretar por la mayor parte de consumidores, es decir, atributos como brillo y color (piel, branquias, vísceras), aspecto del ojo (abombado, plano, hundido), forma de las branquias (uniformes, deshilachadas), ... no se les da tanta importancia.

Para realizar el examen organoléptico o sensorial se emplearon dos escalas cuantitativo-descriptivas, de acuerdo al producto sea refrigerado o en conserva:

- a) una para determinar el grado de frescura de sardina fresca almacenada en hielo, de acuerdo con el baremo cuantitativo descriptivo de 10 puntos reflejado por Rodríguez y col.. (1991), modificada y sintetizada a un baremo de 4 puntos, válido también para evaluar el grado de frescura de sardina envasada en Atmósferas Protectoras (Tabla 6). Este análisis se complementa con un análisis sensorial de las sardinas cocidas. Las muestras a análisis, tras su evisceración y descabezado, se introducen en bolsas de plástico alimentario de polietileno y se cuecen en un baño maría (100°C) durante 15 minutos. Las muestras se dejan enfriar hasta una temperatura de entorno a +60°C y se entrega al panel de cata. Este panel evalúa el olor que se percibe tras la apertura de la bolsa; a continuación los ejemplares se colocan sobre un plato blanco y se procede a la elaboración de los filetes, observando primero el color y después un trozo de pescado se lleva a la cavidad bucal y se corta con los incisivos y luego se mastica con las muelas para así determinar su textura, y al mismo tiempo el bolo

alimenticio se presiona con la lengua en el paladar y se determina su sabor y aroma. Eliminar la muestra de la cavidad bucal y evaluar el regusto y la persistencia. Enjuagar la boca entre muestra y muestra. Para puntuar el pescado cocido el panel de cata sigue el baremo expuesto en la Tabla 7.

- b)** para determinar la categoría comercial de la sardina en conserva, se aplica una escala realizada por nuestro laboratorio durante el desarrollo del trabajo (Tabla 8), siguiendo el mismo procedimiento analítico que el desarrollado para el análisis sensorial de sardina fresca cocida.



Tabla 5. Tabla para recogida de descriptores sensoriales específicos.

Especie:	Fecha:	Catador:	Hora:
Atributo	Estado	Descriptor principal	Descriptor secundario
Aspecto córnea	Fresco		
Aspecto cristalino			
Brillo piel			
Color branquias			
Olor branquias			
Aspecto branquias			
Elasticidad peritoneo			
Aspecto vísceras			
Olor vísceras			
Textura (tacto)			
Zona postcefálica	Cocido		
Color músculo			
Olor			
Sabor			
Textura			

Elaboración propia

Tabla 6. Baremo cuantitativo-descriptivo para evaluación de sardina refrigerada.

ATRIBUTOS	PUNTUACION			
	3	2	1	0
ASPECTO GENERAL				
PIEL	Pigmentación viva y tornasolada (irisada); sin decoloración. Mucus acuoso, transparente. Opérculo con mancha amarillo dorado.	Pigmentación viva pero sin lustre. Mucus ligeramente turbio.	Pigmentación en trance de decoloración y marchita. Mucus perceptible, algo lechoso. Opérculo con mancha ligeramente roja o rosada.	Pigmentación marchita, tonos grisáceos. Tonos amarillos o dorado-rojizos. Mucus amarillento, opaco. Opérculo con mancha amarillo o pardo.
OJO	Convexo, córnea transparente. Pupila negro brillante.	Convexo y/o algo aplastado. Córnea ligeramente opalescente. Pupila negra.	Aplastado o plano. Córnea opalescente, algo turbia. Pupila grisacea, algo opaca	Cóncavo en el centro. Córnea lechosa . Pupila gris. Se manifiesta el cristalino.
BRANQUIAS	Color rojo sangre brillante. Sin mucus.	Color rojo mate. Presencia de mucus claro.	Decoloraciones parciales, algo deshilachadas. Mucus en grumos o espeso, opaco.	Amarillentas, pardas o rosadas. Deshilachadas. Mucus lechoso.
COL.UMNA	Blanca. Se rompe en lugar de separarse.	Blanco opaco. Adherente.	Ligeramente rosa. Poco adherente.	Rosa o roja. No adherente.
ORGANOS	Riñones y corazón rojo brillante. Diferenciables y brillo seroso.	Color rojo mate (corazón). Sangre decolorada.	Color rojo pálido. Hay lisis. Presencia de mucus. Brillo céreo.	Color pardo. Lisis general, vísceras poco diferenciables , mucosas.

CARNE ESTADO (al tacto)	Firme y elástica. Superficie lisa.	Disminución de la elasticidad.	Algo blanda, superficie cerosa o aterciopelada. .	Blanda. Superficie aspera o granulosa.
PERITONEO	Negro brillante, adherente y elástico.	Negro, adherente.	Negro, poco adherente (puede aparecer alguna rotura).	Gris, roto o inexistente. Las espinas abdominales salen hacia dentro.
COLOR CARNE (al corte)	Pelágicos: rosada. Blancos: blanca. Irisada, translúcida, lisa y brillante. Fluye la sangre.	Decoloración del original. Aspecto ligeramente translúcido, brillo apagado.	Color blanco o gris claro Brillo céreo. No fluye sangre	Tonos amarillos en la zona próxima a la superficie Opaca.
OLOR				
BRANQUIAS	A mar, algas.	Neutro	Ligeramente agrio o ácido.	Agrio, ácido. Pútrido.
VISCERAS	A mar.	Neutro.	Ligeramente agrio. Algo amoniacal.	Pútrido, ácido, amoniacal. Sulfhídrico.

Elaboración propia

Tabla 7. Baremo cuantitativo-descriptivo para evaluación de sardina cocida (MAP).

ATRIBUTOS			3	2	1	0
OLOR	FRESCO	Branquias	Marino. A alga	Débil alga/ neutro	Débil pescado.	fuerte a pescado
		Cavidad abdominal	Ligero a alga	Débil a alga/ Neutro	A pescado, NH ₃ débil. Débil ácido (MAP)	NH ₃ , SH ₂ , fuerte a pescado
	COCIDO		Específico de la especie	Débil a especie/ Neutro	Dulzón, agradable. Indicio rancidez o débil ácido(MAP)	Rancio, picante, NH ₃ , pescado, SH ₂ (MAP)
COLOR	FRESCO		Gris-Rosada translúcida (carne)	Gris-Rosada. Poco translúcida	Rosada opaca. Gris-crema (MAP)	Rojizo. Blanco amarillento (MAP)
	COCIDO	Músculo	Blanco marfil	Blanco	Blanco-crema	crema oscuro o café con leche claro. Tonos amarillos
		Zona columna	Blanco	Blanco	Crema clarito	Pardo oscuro
TEXTURA			Jugosa. Miotomos consistentes	Débil jugosa	Pérdida jugosidad. Algo fibrosa	Seca y/o fibrosa. Harinosa
SABOR			Específico a Sardina	Débil a Sardina/ neutro	Dulce, extraño pero agradable.	Picante. Rancio. Amargo

(*) MAP: Envasadas en Atmósferas Protectoras. Elaboración propia

Según criterio del catador se pueden dar valores intermedios.

La columna donde se representan los atributos de puntuación 0 (no apto), prácticamente pertenecen al valor entre 1 y 0, sensaciones peores que éstas se encuadrarían en el valor 0: olores o sabores más fuertes a los descritos (putrefactivos).

Tabla 8. Escala cuantitativa-descriptiva para evaluar la clase comercial de sardina en conserva importante descartar aromas u olores del aceite de cobertura).

ATRIBUTOS		PUNTUACION			
		3	2	1	0
OLOR		Olor suave, muy agradable, como a pescado ligeramente salado	Débil a sardina en conserva, poco específico, agradable o neutro.	Dulzón, ligeramente agradable. Indicios de rancidez, débil a ácido.	Rancio, picante, amoniacal, extraño o atípico pero desagradable.
COLOR	Músculo	Blanco marfil.	Blanco, blanco crema.	Crema, levemente rosado.	Crema oscuro o café con leche claro. Tonos amarillentos, rosados o rojizos.
	Marca de la espina	Blanco.	Crema claro, café con leche claro.	Café con leche, pardo rojizo.	Pardo oscuro, marrón, rojo.
TEXTURA		Jugosa, firme, óptima. Miotomos consistentes.	Débilmente jugosa, algo blanda o dura. Fibrosa.	Dura y/o seca. Algo fibrosa.	Muy dura ; muy seca; muy blanda; pastosa; pulverulenta, correosa, harinosa.
SABOR		Específico a sardina. Muy suave y agradable.	Débil a sardina. Algo soso o salado, pero agradable.	Dulce; extraño pero no desagradable. Soso, salado, insípido o neutro, algo rancio.	Picante; metálico; rancio, amargo, ácido, sabores anómalos desagradables .

Elaboración propia

Los datos y comentarios se rellenan en el cuestionario presentado a los catadores tanto para sardina fresca como para sardina en conserva (Tabla 9 y Tabla 10, respectivamente). Las pruebas organolépticas según cada grupo de ensayos, fueron realizadas por un panel de hasta 8 jueces, entrenados en el análisis sensorial de pescado fresco y en conserva. En número de participantes dependía de la disponibilidad personal, pero siempre garantizando un mínimo de 4 catadores entrenados. Estos resultados se resumen en la Tabla 11.



Tabla 9. Modelo de cuestionario para evaluar sardinas almacenadas en hielo.

Nombre del juez: Fecha: Hora:
Muestra n°: Especie:

Determinación de las características en fresco.

ATRIBUTO		PUNTUACION	TOTAL
ASPECTO			
1	Ojo		
2	Branquias		
3	Piel		
4	Textura al tacto		
5	Visceras		
6	Peritoneo		
7	Columna vertebral		
8	Color del músculo		
SUBTOTAL		(media de 1 a 8)x1=	A
OLOR			
9	Branquias		
10	Visceras		
SUBTOTAL		(media de 9 a 10)x3=	B
Valor Global		(A+B)/4=	Q

Determinación de las características en cocido

ATRIBUTO	PUNTUACION	TOTAL
Olor	x 3=	C
Color	x 1=	D
Sabor	x 4=	E
Textura	x 2=	F
Valor Global	(C+D+E+F)/10=	Qc

COMENTARIOS:

Elaboración propia

Tabla 10. Modelo de cuestionario para evaluar una conserva de sardina.

Nombre del juez: _____ Fecha: _____ Hora: _____
Muestra n°: _____ Marca Comercial: _____
Especie: _____
Indique con una X el valor que corresponde a cada atributo sensorial.

ATRIBUTO SENSORIAL	PUNTUACION						
	3	2,5	2	1,5	1	0,5	0
Color del músculo							
Color de la marca de la espina							
Olor							
Aroma							
Textura							
Aceite de cobertura *							
Exudado acuoso **							

*, indique el color, turbidez, suciedad y volumen (ml).
**, indique el volumen (ml), color y sólidos en suspensión.

VALOR Q =

Aceptación Global (seleccione una categoría con X):

Excelente ☐ Buena ☐ Mala ☐

Qué orden de preferencia daría a cada atributo (indicar de 1 a 4, siendo 4 el valor más importante):

Color: ☐ Olor: ☐ Aroma: ☐ Textura: ☐

COMENTARIOS:

Elaboración propia

Tabla 11. Tabla de recogida de resultados sensoriales definitivos por panel de cata, para *Sardina pilchardus*.

LEER ATENTAMENTE ESTA PAGINA ANTES DE COMENZAR A CUBRIR LA SIGUIENTE TABLA. Los factores mencionados en la tabla se describen en un baremo sensorial adjunto propuesto por el autor, modificado del baremo de la CEE para la especie en cuestión, y que el catador seguirá a la hora de puntuar en la columna denominada como Muestra nº Ptos. Finalmente, si se desea hacer constar algo, por favor cubrir el apartado de OBSERVACIONES destinado a tal efecto.

TABLA DE RESULTADOS DEL ANALISIS SENSORIAL SARDINA FRESCA/REFRIGERADA

CATADOR:

FECHA:

ESPECIE:

HORA:

ATRIBUTOS			Fi	MUESTRA 1 Ptos	MUESTRA 2 Ptos	MUESTRA 3 Ptos	MUESTRA 4 Ptos
ASPECTO GENERAL (A)	ESTADO	PIEL	1				
		OJO					
		BRANQUIAS					
		COLUMNNA					
	COLOR	ORGANOS	3				
		CARNE					
		PERITONEO					
		CARNE FRESCO					
OLOR (O)	CARNE COCCION	3					
	BRANQUIAS						
	VISCERAS						
	COCCION						
TEXTURA (T)		COCCION	2				
SABOR (S)		COCCION	4				
Valor Q							

Valor Q: representa el valor cuantitativo dado a un factor/atributo determinado, que se localiza en la tabla sensorial adjunta (Baremo Cuantitativo-Descriptivo). Se admiten valores medios en unidades de 0.5. El valor 3,0-2,8 representa un producto excelente (calidad extra); 2,7-2,1 estándar; 2-1,1 aceptable, en el límite de aptitud; y finalmente 1,0-0 decomisado o rechazable. El Valor Q se calcula como:

$$\text{Valor Q} = [(Ax1) + (Ox2) + (Tx3) + (Sx4)] / 10$$

donde:

A = Valor medio de las puntuaciones de los atributos correspondientes al aspecto.

O = Valor medio de las puntuaciones de los atributos correspondientes al olor.

T = Valor medio de las puntuaciones de la textura.

S = Valor medio de las puntuaciones del sabor.

A continuación, según criterio de cada catador dar una categoría en un contexto global (GLOBAL), independiente de los valores dados a cada factor:

BUENA.....A

ACEPTABLE.....B

MALA.....C

OBSERVACIONES:

En el cuestionario de conservas se describen las características del color (músculo y marca de la espina), olor, aroma y textura de la sardina en conserva, así como información adicional a cerca del aceite de cobertura y del exudado acuoso. Para ello, se procede a un análisis visual exterior del contenido para observar el empaque, suciedad, tamaño,... Se vacía el contenido (tras la eliminación del aceite) en un plato y se determina el olor. Posteriormente, se abren los ejemplares (hacer "filetes") y se puntúa el color del músculo y de la marca de la espina. Una muestra se lleva a la cavidad bucal y se corta con los incisivos y luego se mastica con las muelas para así determinar su textura, y al mismo tiempo el bolo alimenticio se presiona con la lengua en el paladar y se determina su sabor y aroma. Eliminar la muestra de la cavidad bucal y evaluar el regusto y la persistencia. Enjuagar la boca entre muestra y muestra.

La valoración del análisis sensorial para la sardina en conserva se basa en el sistema Karlsruhe modificado por Besteiro y col. (1993) para atún (*Thunnus albacares*) congelado y en conserva. Para calcular la puntuación global o general (Valor Q) se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Valor Q} = [(Cx1) + (Ox2) + (Tx3) + (Sx4)] / 10$$

donde:

C = Valor medio de las puntuaciones del color.

O = Valor medio de las puntuaciones del olor.

T = Valor medio de las puntuaciones de la textura.

S = Valor medio de las puntuaciones del sabor.

La escala de puntuación va desde un valor de 3 (producto muy fresco) hasta 0 (producto no apto). Se admiten puntuaciones intermedias (0,5 puntos). Las categorías comerciales consideradas son las expuestas en la Tabla 12:

Tabla 12. Categorías comerciales tanto para sardina fresca como para sardina en conserva.

Categoría	Puntuación
Clase Extra (o Excelente)	$2,25 \leq a < 3$
Clase III (Buena)	$1,50 \leq a < 2,25$
Clase III (Estándar)	$1,05 \leq a < 1,50$
Clase 0 (Decomisible)	$0 \leq a < 1,05$

Para el análisis QIM de sardina fresca se desarrolla un esquema previo de 12 atributos sensoriales en fresco, 4 atributos a la hora de evaluar y comparar los tronquitos de sardina (eviscerada) envasada en MAP y de 8 atributos para sardina eviscerada cocida a vapor, que se exponen en las Tabla 13, Tabla 14 y Tabla 15, respectivamente.

Tabla 13. Esquema QIM preliminar desarrollado para sardina (*Sardina pilchardus*) entera refrigerada.

Parámetro		Descriptor	Puntos demérito
Ojo	Córnea	Transparente	0
		Ligeramente turbia	1
		Opaca	2
	Cristalino	Inapreciable	0
		Ligeramente aparente	1
		Manifiestamente apreciable	2
	Aspecto	Abombado, convexo	0
		Plano	1
		Ligeramente hundido	2
		Hundido, cóncavo	3
Branquias	Aspecto	Filamentos uniformes	0
		Fibras parcialmente deshilachadas en borde	1
		Fibras deshilachadas desde la base	2
	Color	Rojo sangre, brillante	0
		Rojo oscuro mate	1
		Rosa claro	2
		Amarillo, pardo	3
	Mucus	Transparente, uniforme	0
		Agregados o ligeramente turbio	1
		Lechoso	2
	Olor	Fresco, "a mar"	0
		Neutro	1

Apariencia		"A pescado"	2
		Ligeramente agrio, mohoso,	3
		ligeramente rancio	4
		Rancio, pútrido, desagradable	
	Piel	Brillante, opalescente o iridiscente	0
		Ligeramente brillante	1
		Sin brillo, zonas oscuras o roturas en abdomen	2
	Opérculo	Amarillo dorado	0
		Gris	1
		Rojo claro en una superficie inferior al 50%	2
		Rojo oscuro a pardo en superficie >50%	3
Textura	Zona dorsal	Elástica, firme, dura	0
		Ligeramente elástica	1
		Blanda	2
	Abdomen	Firme, vísceras diferenciables y serosas	0
		Blando, vísceras ligeramente diferenciables	1
		Muy blando, Vísceras lisadas	2
	Peritoneo	Negro, elástico	0
		Grisáceo, ligeramente elástico	1
		Sin elasticidad, roturas	2

Índice de Calidad (QIM):
Elaboración propia

0-29

Tabla 14. Esquema QIM preliminar desarrollado para sardina (*Sardina pilchardus*) eviscerada refrigerada, envasado en MAP.

Parámetro		Descriptor	Puntos demérito
Olor		Fresco, “a mar”	0
		Neutro	1
		Extraño, poco definido, pero agradable	2
		Ligeramente agrio, ligero “a pescado” o rancio, mohoso	3
		Acido, amoniacal, rancio, desagradable	4
Apariencia	Piel	Brillante, opalescente o iridiscente	0
		Ligeramente brillante	1
		Sin brillo, zonas oscuras o roturas en abdomen	2
Textura	Zona dorsal	Elástica, firme, dura	0
		Ligeramente elástica	1
		Blanda	2
	Peritoneo	Negro, elástico	0
		Grisáceo, ligeramente elástico	1
		Sin elasticidad, roturas	2

Índice de Calidad MAP (QIM):
Elaboración propia

0-10

Tabla 15. Esquema QIM preliminar desarrollado para sardina (*Sardina pilchardus*) eviscerada cocida.

Parámetro		Descriptor	Puntos demérito
Olor		Específico, “a sardina”	0
		Neutro	1
		Dulzón, ligeramente agrio, extraño agradable	2
		Rancio o ligero “a pescado”	3
		Amoniaca, intenso a rancio, fuerte “a pescado”, ácido	4
Color	músculo blanco	Blanco marfil	0
		Blanco	1
		Blanco crema, ligeras extravasaciones sanguíneas	2
		Ligeramente crema, extravasaciones sanguíneas	3
		Crema, o bordes amarillos	4
Color	zona columna	Sin marca, blanco marfil	0
		Ligera marca crema	1
		Marca parda	2
		Parda con invasión a músculo adyacente	3
		Textura	Dureza
Muy blanda	1		
Dura	2		
Jugosidad	Jugosa		0
	Ligeramente jugosa		1
	Seca		2
Fibrosidad	Evidente, fibras desmenuzables		0
	Fibras fácilmente desmenuzables		1
	Harinoso, o fibras duras, no desmenuzables		2
Firmeza	Firme		0
	Ligeramente firme	1	
	Desmoronamiento de estructura	2	
Sabor		Específico, “a sardina”	0
		Neutro, insípido	1
		Ligeramente dulce	2
		Ligeramente agrio, ligeramente rancio	3
		Rancio, intenso “a pescado”, desagradable, ácido	4
Incidencia Calidad en cocido (QIMc)			0-23

Elaboración propia

Los descriptores han sido desarrollados por la percepción y experiencia adquirida durante el deterioro de la sardina en diferentes condiciones de almacenamiento, descriptores que el mismo autor de este trabajo desarrollo inicialmente con una tabla descriptiva-cuantitativa (Rodríguez y col., 1991). En este caso, los atributos de puntúan de 0 a un máximo de 4, donde 0 representa las mejores cualidades sensoriales del pescado a evaluar. En el caso de pescado envasado en MAP (atmósferas protectoras y vacío), los atributos se reducen con lo cual a la hora de comparar la metodología QIM y equilibrar la evaluación con ejemplares de sardina entera sólo se contemplan los atributos en común con el envasado en MAP, esto es, olor del tronco de sardina (sin cabeza y vísceras), aspecto de la piel, la textura del músculo y del peritoneo.

Se realizaron prácticas con los futuros evaluadores o jueces para familiarizarse con los diferentes esquemas sensoriales a aplicar. El límite de aceptación sensorial de la sardina en el tiempo de almacenamiento se realiza en base al rechazo general (valor Q medio) por parte de los jueces (por mayoría), siempre por debajo de 1 punto.

Para representar gráficamente los diferentes lotes, se acompaña al catador de un gráfico de telaraña de 6 pts para evaluar la intensidad de los parámetros a evaluar (Imagen 19).

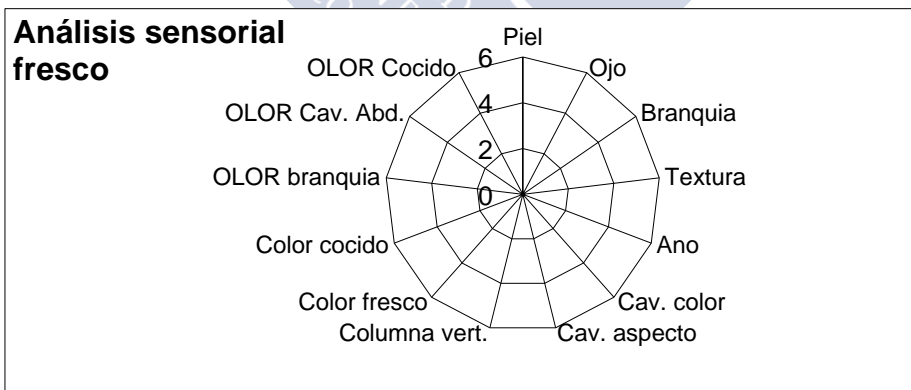


Imagen 19. Perfil sensorial para sardina (tela de araña).

Análisis estadístico. Para establecer el esquema definitivo QIM, los datos sensoriales se someten a un análisis de correlación con otros parámetros químicos evaluados y con el tiempo de almacenamiento realizados en la facultad de Matemáticas de la USC. Un análisis de componentes principales (PCA) se aplica para evaluar la importancia de cada parámetro sensorial durante el almacenamiento y deterioro del pescado. Se estima la incertidumbre de la predicción de días de almacenamiento para QIM usando la regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS), con un nivel de confianza del 95% para todos los test estadísticos aplicados. El análisis de PCA para conocer aquellos parámetros sensoriales que presentan unos cambios más definitorios en relación al periodo de almacenamiento en hielo se representa en la Imagen 20.

Todos los parámetros presentan una alta correlación con el análisis de PCA. El primer componente (PC1) explica la mayor parte de la varianza (91,35%) mientras que el segundo componente (PC2) influye en un 3,02%. Los principales parámetros de PC1 han sido el periodo de almacenamiento (0,989), la pupila (0,992), la textura dorsal (0,983) y la rotura de la pared muscular ventral (0,980). En el caso de PC2, el aspecto de la córnea (0,31) y el olor de las branquias (0,29) son los parámetros más influyentes en la categorización de calidad sensorial. Estos parámetros mencionados son los que justifican en más del 95% del total de la información adquirida por el baremo QIM, desarrollado para sardina.

Este índice de calidad sensorial, como la suma total de los parámetros aumenta linealmente con el tiempo de almacenamiento en hielo. Su evolución se representa por la ecuación $QI=2,65x+1,71$, donde x =días en hielo, con una $r^2=0,972$. El análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) indica que el modelo de regresión propuesto presenta un error estimado de 1,05, con una $p<0,001$. El tiempo de almacenamiento en hielo se puede estimar con una precisión de 1 día.

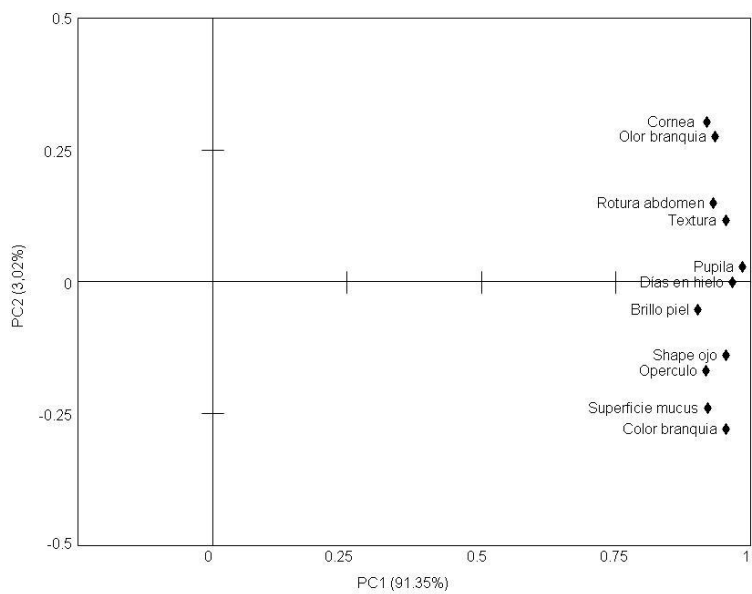


Imagen 20. PCA del análisis de sardina fresca.

JUREL: En este caso, la evaluación de las características físicas en fresco se realiza siguiente el baremo descriptivo del derogado R.D 331/1999, sustituyendo las categorías de frescura (4) por puntos, de 0 a 3, donde 0 representa un producto alterado y 3, con sus atributos mejores. Se permiten puntuaciones intermedias de 0,5 puntos, y el límite de rechazo se establece en 1,0. Para la evaluación sensorial en cocido se emplea la siguiente tabla (Tabla 16) desarrollada por Tecnología de Productos Pesqueros (USC).

Tabla 16. Baremo cuantitativo-descriptivo para jurel cocido.

PUNTUACION				
	3	2	1	0
OLOR	Específico, a jurel	Neutro, extraño pero agradable.	Dulzón, agradable, algo a pescado (TMA)	Rancio, NH ₃ , picante, a pescado.
COLOR	Blanco crema suave (marfil).	Blanco crema.	Crema claro o blanco.	Crema pardo, café con leche claro, tonos amarillentos.
TEXTURA	Jugosa, miotomos consistentes.	Ligeramente jugosa	Pérdida de jugosidad, algo seca, algo dura.	Seca y fibrosa, dura, harinosa, gomosa, adherente, cerosa.
SABOR	Específico, fuerte a jurel.	Neutro o ligero a jurel.	Dulce, agradable	Picante, rancio, amargo.

Elaboración propia

3.3.E. Tratamiento estadístico.

El tratamiento estadístico empleado con la finalidad de hallar posibles diferencias significativas entre las diferentes fases/lotés y días en los distintos experimentos en refrigeración, para cada una de las variables, fue un ANOVA de un factor, en caso de obtener una diferencia significativa $p < 0,05$ entre grupos. Se aplicó un test de comparaciones múltiples Post-hoc de Student-Newman-Keuls con una $p < 0,05$. Las variables que no cumplían los parámetros de Normalidad y de homogeneidad de las Varianzas fueron transformadas.

El estudio de las diferencias durante el almacenamiento refrigerado y entre diferentes fases de procesado de conservas (materia prima, cocción y esterilización) para cada día fue determinado por Análisis de Varianza y Test del Rango Múltiple de Duncan ($n=5$).

Para la realización de los análisis estadísticos se utilizó el programa SPSS®.



3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL.

3.4.1. Efectividad de la conservación del pescado a bordo con Agua de Mar Enfriada.

El desarrollo de este ensayo, se lleva a cabo con jurel (*Trachurus trachurus*) especie gregaria pelágica, capturada por artes de cerco, si bien, los ensayos preliminares para el diseño del tanque se realizan con bacaladilla (*Micromesistius poutassou*) en buques de arrastre de pareja litoral.

Para la evaluación de la aptitud del sistema se emplea inicialmente un tanque isoterma de PP de 200 l (Imagen 21), se realizan los ensayos necesarios a bordo de un arrastrero litoral, dedicado a la captura de bacaladilla (*Micromesistius pootassou*) para diseñar un tanque fiable, eficaz y práctico, así como optimizar la carga de pescado más adecuada en agua de mar enfriada (AME o CSW).



Imagen 21. Tanque isoterma 200 l para pruebas AME preliminares

El sistema del tanque consta de una bomba de recirculación interna, ubicada en el fondo. Ensayos preliminares en tierra aconsejan usar tanques con paredes de 5 cm ya que mantienen mejor las capacidad térmica de los tanques cuando éstos se exponen a temperatura ambiente, al sol y durante 24 horas (la temperatura del agua al cabo de este tiempo se mantiene a $-1,1^{\circ}\text{C}$).

La proporción hielo:agua mar más adecuada tras los ensayos realizados a bordo de un buque de cerco resulta ser 1:2, decisión adoptada por los análisis físicos (pH, temperatura en agua y pescado a distintos niveles del tanque) y apariencia sensorial del pescado.

El sistema del tanque definitivo consta de una bomba de recirculación externa (flujo 33 l/min, Imagen 22), con un sistema de distribución (en PVC) del agua enfriada de tal forma que se recoge por el fondo del tanque (con filtros adecuados para retener escamas de bacaladilla, Imagen 23) y se distribuye por la cima del tanque a nivel interno para atravesar la capa de hielo por diferentes puntos (Imagen 24). Con esta relación de AME, se realizan diferentes pruebas de carga de pescado:AME, 1:1, 1:2, 1:3, y 1:4 (Imagen 25). La temperatura media del pescado es de $+13,2^{\circ}\text{C}$ en el momento del introducir a los tanques (agua enfriada a $-1,0^{\circ}\text{C}$, Imagen 26); el tanque se mantiene a temperatura ambiente durante 12 horas, periodo tras el cual el pescado del fondo del tanque (el menos frío) adquiere $-0,4^{\circ}\text{C}$ (tras 1 hora alcanza entre $+0,2/+0,5^{\circ}\text{C}$), con un aspecto organoléptico extra (media 2,8), hecho que apoyan las consultas realizadas mediante test afectivos al gremio de compradores y armadores al comparar con el pescado de forma tradicional (Imagen 27). La carga o relación óptima en este caso es 1:2.



Imagen 22. Aspecto del tanque CSW diseñado con vista de la zona de bomba y caja de conexión eléctrica.



Imagen 23. Aspecto interior del tanque CSW con línea de aspiración inferior y línea de expulsión de agua superior.



Imagen 24. Apréciase las diferentes direcciones de salida del agua refrigerada hacia la superficie del hielo.

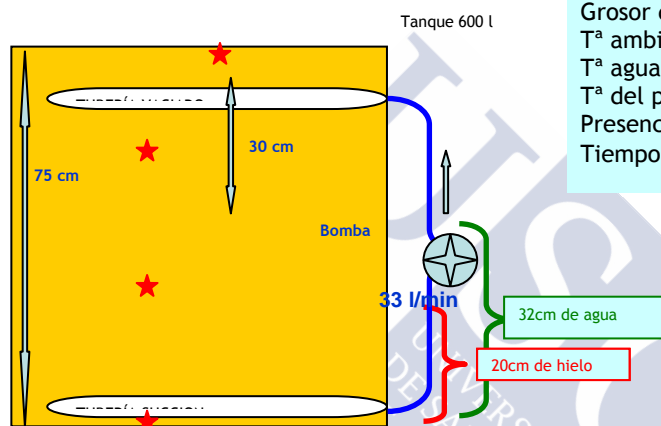
JUREL: Para la preparación del sistema de Agua de Mar Enfriada (AME), media hora antes de la recogida del pescado, en una cuba cuadrada de plástico de 600 l de capacidad, se añaden partes iguales de hielo en escamas y agua de mar de tal forma que ocupan los 2/3 de su capacidad. Previamente se disponen sondas térmicas de penetración en la parte superior y fondo de la cuba. Para homogeneizar la mezcla de agua-nieve se recircula el agua del fondo con una bomba centrífuga, expulsando el agua por la cima de la cuba. La temperatura de la mezcla de agua-nieve tras su homogeneizado es de $-1,3^{\circ}\text{C}$.

Estimación de carga óptima de pescado en CSW

Carga de hielo y agua de mar para conservar el pescado a bordo (<24 horas)

Parámetros de control:

Grosor del tanque
T^a ambiente
T^a agua
T^a del pescado
Presencia hielo (visual)
Tiempo



★ Puntos de control térmico (agua y Pescado)

Pescado: CSW

1	1
1	2
1	3
1	4

12 h, -0,4°C



Sondas PT100
e EBRO pescado



Sondas EBRO
agua

Imagen 25. Esquema de estudio, diseño y parámetros para estimar la carga máxima de pescado.

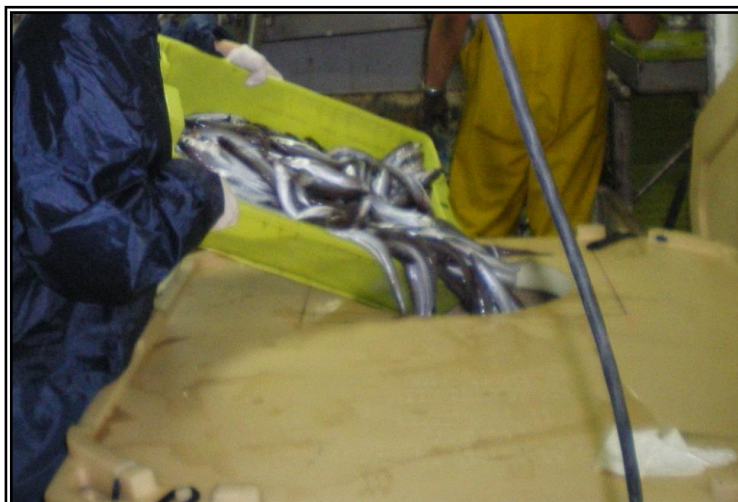


Imagen 26. Llenado de pescado en tanque CSW a través de trampilla, en el parque de pesca.



Imagen 27. Descarga tradicional de lirio en puerto base y adición de hielo en escama.

El jurel inicia su arriado a bordo a las 04:00 horas aproximadamente, retirándose del cerco con un xalabardo (Imagen 28) y depositado directamente en la mezcla agua-nieve, hasta cubrir

totalmente la cuba plástica. Se introduce otra sonda térmica inalámbrica (*iButton*) en el interior de un jurel, penetrando por la boca hasta nivel de la columna vertebral tal y como se indica en la siguiente serie de imágenes (Imagen 29), para observar el tiempo que tarda en estabilizarse la temperatura en el centro del pescado.



Imagen 28. Recogida de jurel con xalabardo a bordo del Cangrexo.

Una muestra control lo representa un conjunto de jureles tratados de forma habitual por la flota de cerco (Imagen 30). El pescado se vacía del xalabardo sobre cajas de madera de 20-30 kg desde una altura aproximada a un metro. Con los ejemplares debatiéndose en las cajas y golpeándose contra las paredes, un operario procede a esparcir sobre los ejemplares unas paladas de hielo en escama desde cierta distancia. Se colocan otras cajas de madera sobre estas muestras control y se repite el procedimiento, hasta finalizar con el arriado total del pescado.



Imagen 29. Preparación de pescado con sondas iButton: incisión, introducción sonda, marcado exterior con plástico PE y con sonda iButton



Imagen 30. Acondicionamiento con hielo del pescado en sus cajas definitivas.

Tras la captura del pescado hasta su descarga en el puerto de Portosín (Imagen 31) transcurren 2 horas de travesía (8:30 a.m). Se retiran 120 ejemplares aproximadamente de jurel de la cuba con AME y otros tantos ejemplares del control.



Imagen 31. Descarga típica de jurel en puertos gallegos..

Ambos lotes se colocan en cajas de poliestireno expandido de 20 l, a las que se añaden hielo y se transportan hasta el laboratorio en un vehículo isotermo. En el laboratorio y en el mismo día se procede a la realización de los análisis (día 0) y el resto de los ejemplares se almacenan en cajas de plástico con drenaje, colocados en disposición dorsal y alternadamente en una sola fila, cubiertos de hielo picado y almacenados en cámara fría a 4°C. Se realiza una toma de muestras por triplicado al 3º, 5º, 7º y 10º día de almacenamiento. El hielo se repone cada vez que se observa que hace falta, de tal manera que los ejemplares estén siempre cubiertos.

Análisis realizados:

- a) Degradación: BVT, TMA, TBA, aminas biógenas y catabolitos del ATP.
- b) Análisis sensorial de la materia prima refrigerada y cocida.

3.4.2. Envasado y almacenamiento del pescado en Atmósferas Protectoras. Estudio de vida útil.

Las muestras de sardina se capturaban de madrugada frente a la costa Atlántica gallega, sobre la plataforma continental y un área comprendido entre la Isla de Ons por el sur y el Cabo Finisterre al norte, entre mayo de 1992 y 1994. Para obtener las muestras y realizar un seguimiento de manipulación correcta de las mismas, personal del laboratorio se embarcó en los cerqueros de Portosín (A Coruña, Imagen 32), tomando personalmente las muestras tras la recogida del aparejo, manipulándolas y guareciéndolas adecuadamente a bordo, con hielo en escamas en proporción pescado:hielo de 4:1.



Imagen 32. “Cangrexo”, cerquero de Portosín, donde se realizan la mayor parte de las experiencias.

Desde el momento de recogida del aparejo hasta su manipulación para elaborar los diferentes lotes en el laboratorio, el tiempo transcurrido se halla entre 4 y 7 horas, recibiendo siempre los ejemplares en estado de *rigor mortis* (Imagen 33). El transporte desde el puerto hasta laboratorio se realiza con una furgoneta refrigerada. Las muestras se almacenaban en cajas de PP con hielo hasta su descarga en puerto (transcurren entre hora y media y dos horas. En

puerto se retira 1-2 cajas de 20-30 kg de sardina en estado de *rigor mortis* con una capa de hielo (4:1) que se transportaba al laboratorio en un vehículo isoterma.



Imagen 33. Sardinas recién descargadas en estado de rigor mortis.

En el laboratorio las muestras se descabezan y evisceran, se lavan en agua enfriada por hielo (con un 2% de ClNa) durante 5 minutos, se escurren y secan al aire sobre una rejilla plástica en cámara fría (+4°C) durante 5-10 minutos y se procede a su Envasado en Atmósferas Protectoras (EAP o MAP). Los ensayos que implican envasado a vacío, sólo se usan bolsas polipropileno:poliamida biorientada (70:30) de 60 µm, de PLASTICOS ARIAS.

Se emplearon tarrinas de plástico alimentario barrera a los gases, y una almohadilla absorbente para líquido exudado (Imagen 34), de composición PP/EVOH/PP de 1000 µm, selladas con film PP/PA biorientada (70:30) de 60 µm, suministradas por *Plásticos Arias* (Lugo). En cada envase se introducían de 6-10 sardinas dependiendo del tamaño (Imagen 35). Se procedía a un vacío 98% y posterior introducción del gas (suministrado por *Carbueros Metálicos, S.A.*),

siempre con una pequeña presión negativa (-0,2 bar). Finalmente se procede al sellado a +170°C con una termoselladora YANG (Imagen 36).

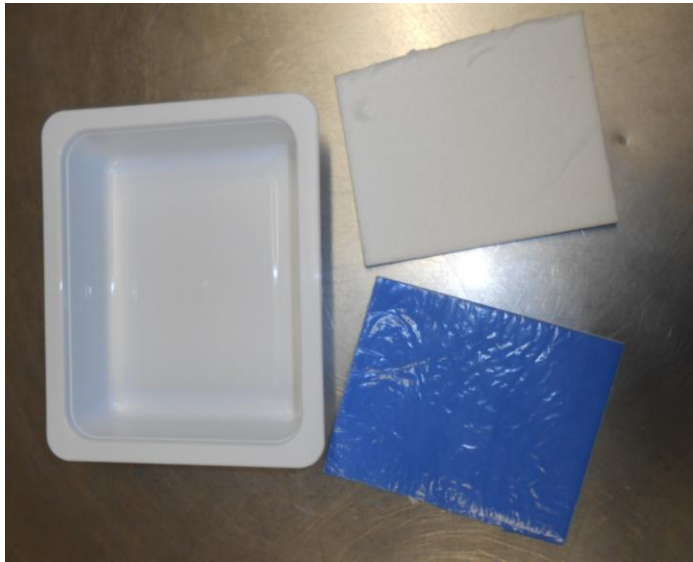


Imagen 34. Material utilizado para envasado en EAP.



Imagen 35. Aspecto de los tronquitos de sardinas envasados en EAP.

Cada vez que se realizaba un ensayo con EAP, ejemplares de sardina descabezada, eviscerada y envasadas en tarrinas y metidas en bolsas con aire se utilizaban como muestras CONTROL, al igual que un lote de sardinas enteras y almacenadas con hielo en envases plásticos de PP con sistema de drenaje (CONTROL T), que es el sistema tradicional de conservación de la sardina. Estos controles y los ejemplares en EAP se almacenaban en cámara fría, a 2 temperaturas (+2°C o +4/+5°C).

Las pruebas de EAP se realizaron en diferentes épocas del año, ya que la captura de los ejemplares por el barco que empleamos no era siempre exitosa; en otras ocasiones la talla, como era de esperar era diferente. Además, hay que tener en cuenta que la realización de otra toma de muestras en la fecha prevista para un experimento se veía dificultada por los temporales y establecimiento de vedas por parte de la Administración Gallega. Para realizar siguientes pruebas empleando otras atmósferas protectoras era preciso obtener los datos de la prueba anterior, lo cual se demora en el tiempo de 4 a 5 meses. En las pruebas siguientes se empleaban los mismos controles (eviscerada y envasada en aire, y entera con hielo) y una de las mezclas gaseosas empleadas en la prueba anterior.

Las mezclas gaseosas empleadas fueron:

Prueba	CO₂	N₂	O₂
EPA50	50	50	-
EPA60	40	60	-
EPA20	80	20	-
EPA75	75	20	5
Vacío			
Aire (control)	0,5	70,5	29

Análisis realizados:

a) Composición: Humedad, grasas, proteínas y cenizas.

b) Degradación: BVT, OTMA, TMA, TBA, aminos biógenas y catabolitos del ATP.

c) Análisis organoléptico de la sardina refrigerada y cocida.



Imagen 36. Equipo para envasado en EAP.

La toma de muestras se realizaba cada 1-2 días, finalizando el experimento cuando todas las muestras manifestaban sensaciones claramente alteradas y/o putrefactivas. La toma de muestras para cada prueba se realiza por triplicado, cada réplica constituida por los filetes de 6-8 sardinas, en función de su talla.

3.4.3. Elaboración de conservas.

El proceso realizado en laboratorio es el seguido por algunas de las industrias del sector. A partir de sardina almacenada en cajas con hielo se procedió al corte de la cabeza, aleta caudal y a la evisceración de las piezas. Para ello se les practicó un corte en la zona de la nuca y se tiró de la cabeza hacia fuera (Imagen 37) entre granos de sal para facilitar la manipulación, arrastrando gran parte de la masa visceral, simulando la evisceración manual o mecanizada efectuada en la industria conservera (Imagen 38).



Imagen 37. Primera fase de preparación de sardina para envasado.



Imagen 38. Aspecto de piezas de sardina tras corte y lavado.

Posteriormente, se sumergieron en un baño de salmuera saturada (23%) a temperatura ambiente (18°-22°C) con suave agitación durante 10 minutos aproximadamente, para favorecer el descamado y la penetración de la sal en el músculo para aportar una textura más firme (Imagen 39).

En el siguiente paso se retiraron las piezas, escurriéndolas de agua y escamas. A continuación, se cortaron las piezas de manera que se adecuase su tamaño al del envase (RO-100 o RR-125 con cuerpo y tapa de fácil apertura, que son las empleadas en esta experiencia) y se empacan (Imagen 40). Luego se sometieron a una cocción a vapor (95-100°C) durante 15 minutos en un cocedor mixto de 40 l, a vapor saturado ILPRA, con la parte abierta del envase hacia abajo para el escurrido del agua (y grasa).



Imagen 39. Secuencia completa entre etapa de recepción y pescado preenvasado.

Una vez terminado este paso se dejaron enfriar las latas a temperatura ambiente (30 min) añadiendo, una vez enfriadas, el aceite de girasol comercial templado (50-60°C). Tras realizar el cierre en una máquina cerradora semiautomática Somme, se lavaron las latas para eliminar los restos de aceite y se procedió a la esterilización.

El control térmico y por tanto de su valor de esterilidad, o valor F_0 , se realiza con sondas programables *iButton* (Imagen 41) que se adapta con la parte lectora hacia el punto frío de la conserva (Imagen 42). La esterilización Esta se realizó en un autoclave STERN, a una

temperatura y tiempo preestablecidos para cada diseño experimental, con calentamiento por ducha y control de presión a 1500 psi (Imagen 43).



Imagen 40. Envases con sardinas cocidas.



Imagen 41. Sondas iButton, sin y con protección para acoplar en envases.

Finalizada la esterilización, las latas se enfrían rápidamente en el autoclave hasta los $+37^{\circ}\text{C}$ aproximadamente, retirando las latas de éste y continuando el enfriamiento con una inmersión en agua corriente a temperatura ambiente ($15\text{-}20^{\circ}\text{C}$). Finalmente, se almacenaron durante un período mínimo de 3 meses a $20\text{-}22^{\circ}\text{C}$, aproximadamente, para permitir la maduración de la conserva.



Imagen 42. Sonda iButton incorporada a la sardina cocida, para registro de temperatura en punto frío.



Imagen 43. Esterilizador STERN usado para las pruebas de conservas de sardina.

Pruebas:

El estudio de elaboración de conservas se divide en 3 partes:

- a) El primero pretende observar como influye el binomio tiempo-temperatura de esterilización sobre la materia prima y en particular sobre los compuestos de degradación, así como en términos de seguridad alimentaria con *C. botulinum*, aplicando parámetros tecnológicos de esterilización más bajos a los aplicados en la Industria Conservera
- b) la segunda encaminada a determinar el comportamiento de los diferentes compuestos de degradación a lo largo del proceso de descomposición de la sardina mantenida en hielo y como se comportan éstos durante la elaboración de conservas.
- c) Un último experimento consistió en un estudio de mercado de algunas marcas de sardina en conserva y su comparación con latas de sardina de los procesos realizados en el presente trabajo.



3.4.3.1. I Experimento. Efecto del tiempo y la temperatura de esterilización sobre la composición química de la sardina.

La sardina (*Sardina pilchardus*, Walb.) se capturó en Mayo de 1995 en la plataforma gallega (NO, España), con una talla media de 121,4 mm y 18,27 g de peso. El transporte fue realizado en una nevera portátil isotérmica, hasta su llegada al laboratorio, donde se procedió inmediatamente al procesado de la misma, según el proceso de elaboración antes descrito.

La esterilización se realizó combinando dos tiempos (40 y 50 minutos) y dos temperaturas (+115° y +120°C), de manera que se usaron los siguientes binomios tiempo-temperatura: 115°/40', 115°/50', 120°/40' y 120°/50'. Con este diseño se pretende observar la influencia de las diferentes condiciones de esterilización sobre los diferentes compuestos estudiados y sobre la materia prima, de forma que se cubra el rango de tiempos y temperaturas que podrían ser empleados en la industria conservera para este tipo de envase.

Una vez esterilizadas las latas y tras un periodo de maduración (20 latas por tratamiento), se procede a la recogida de muestras al azar (n=5).

Los puntos de toma de muestra del proceso han sido:

- Materia prima en hielo.
- Materia prima al final de la fase de salmuera.
- Materia prima después de la cocción a vapor 95°-100°C.
- Las latas al terminar la fase de maduración.

Análisis realizados:

- a) Composición: Humedad, grasas, perfil de ácidos grasos, proteínas y cenizas.
- b) Degradación: BVT, TMA, aminas biógenas e catabolitos del ATP.
- c) Análisis sensorial del producto en conserva.

Resistencia térmica de *Clostridium botulinum* durante la esterilización:

El objetivo concreto de esta tarea es verificar la posible supervivencia del principal microorganismo peligroso que puede subsistir en un producto en conserva, de acuerdo a un mismo formato, pero con distintos parámetros de esterilización, y por tanto diferente Valor de letalidad (F_0) y diferentes cualidades sensoriales. Para ello se adquiere *C. botulinum* tipo E, cepa CECT 4611, del CECT de la Universidad de Valencia.

Ejemplares de sardina fresca (son sometidos a un proceso de elaboración de conservas de forma tradicional tal y como se ha descrito anteriormente. En la etapa postcocción, se inocula *C. botulinum*, $n=5$ (Imagen 44).

El nivel de esporos de la solución madre es de $2,6 \times 10^7$ ufc/ml. Se inocula 1 ml de esta suspensión que se distribuye en diferentes sardinas de una misma lata, inyectándolas con una jeringa de PE. Se procede a su llenado con aceite de girasol, cierre, con un tiempo de espera de 1 h (que es el tiempo mínimo que se ha podido observar en la Industria antes de proceder a la última fase del proceso: la esterilización.



Imagen 44. Inoculación de esporos de *C. botulinum* en muestras de sardina.

Los envases RR-125 de hojalata se esterilizan a diferentes temperaturas y tiempos (basados en valor F_0), según programa siguiente:

110°C 30 min

110°C 50 min.

110°C 80 min.

115°C 30 min.

115°C 50 min.

Muestras sin inocular son esterilizadas en idénticas condiciones a los expuestos anteriormente, con el fin de evaluar sus cualidades organolépticas. En cada tratamiento se incorpora una sonda *iButton* para controlar el progreso térmico en el centro del producto, y así verificar su valor F_0 (Imagen 45).

Tras su enfriado en el autoclave hasta los +35°C aproximadamente en el centro geométrico del envase, las latas se almacenan a +2°C, hasta su análisis el día siguiente. Se realiza un lote control, donde también se inyecta la misma concentración de esporos, pero sin someter a tratamiento térmico.

Tras su cierre, se envía rápidamente a cámara frigorífica a +2°C. Los análisis se realizan por quintuplicado. Las muestras se envían a laboratorio de microbiología para el análisis de:

- Recuento de esporos anaerobios mesófilos, que nos indicará la presencia de esporos sin germinar,
- Detección y recuento de anaerobios sulfito-reductores a +37°C, que nos indicará la flora germinada, que se corresponde con *Clostridium* en general.



Imagen 45. Inserción de iButton en sardina cocida en envase RR-125.

3.4.3.2. II Experimento. Comportamiento de los compuestos de degradación en sardina durante el almacenamiento refrigerado y la elaboración de conservas.

Para esta prueba se recogió en el puerto de Portosín, una caja de sardina (aproximadamente 20 kg) en hielo procedente de las capturas realizadas esa misma noche en la plataforma continental de la costa gallega en Junio de 1995.

La sardina se encontraba en *rigor mortis*, presentando un estado óptimo de fresca (estado 3 según la Normativa de la UE). Se procedió inmediatamente a su traslado al laboratorio en un vehículo isotérmico con refrigeración. A su llegada, se repartió la sardina en diferentes lotes disponiéndolos en cajas de PVC alternado capas de hielo y pescado. Las cajas se hallaban perforadas en su base para permitir el drenaje del agua procedente de la fusión del hielo.

Inmediatamente se procedió a su almacenamiento en una cámara fría con una temperatura de $+4^{\circ}\text{C}$. Periódicamente se extrajeron ejemplares para su análisis y procesado.

El análisis organoléptico se realizó todos los días hasta que el estado de deterioro o putrefacción fue evidente. Las determinaciones analíticas y sensoriales se realizaron los días 0 (día de llegada al laboratorio), 3, 5 y 7. Al mismo tiempo, cada uno de estos días se

procesaron sardinas en conserva según el método descrito anteriormente (ver apartado C.3). La temperatura y el tiempo de esterilización seleccionados fueron +115°C, 40 minutos.

El período de maduración (20 latas/día elaboración) fue como mínimo de 40 días a temperatura ambiente (20-22°C).

La duración de la totalidad del procesado realizado en el laboratorio ha sido corta (3 horas), similar al tiempo empleado en una conservera.

Toma de muestras (n=5). Los puntos de muestreo del proceso han sido:

- Materia prima en hielo.
- Materia prima después de la cocción a 100°C.
- Envase esterilizado tras la fase de maduración.

Para realizar los extractos de las muestras procedentes de las latas, a éstas se les escurrió el aceite durante 2 minutos y a continuación se secaron las piezas con papel absorbente de celulosa para eliminar los restos de aceite de la superficie y así atenuar, dentro de lo posible, el influjo de éste en el porcentaje de grasa total. Los extractos se realizaron como se describió previamente. Análisis realizados:

- a) Composición: Humedad, grasas, proteínas y cenizas.
- b) Degradación: BVT, OTMA, TMA, TBA, aminos biógenas y catabolitos del ATP.
- c) También se realizaron análisis organolépticos de la materia prima refrigerada y de las latas de los días de proceso para determinar el comportamiento de la materia prima en diferentes estados de deterioro con el proceso de esterilización.

3.4.3.3. CASOS PRÁCTICOS.

CASO 1. Control de calidad de conservas comerciales. Para la tercera experiencia se han recogido al azar en diferentes tiendas y supermercados de Santiago 10 lotes de distintas latas comerciales codificadas con letras latinas, y de éstos se seleccionaron las 4 marcas comerciales (descartando las marcas blancas), codificándolas desde la A hasta la D, compuesto cada lote por 20 latas RR-125. Sobre estas muestras se realizó un examen organoléptico y análisis químicos.

Los análisis químicos realizados están determinados por las conclusiones generadas a partir del experimento I y II, utilizando aquellos parámetros que sean más estables durante el proceso de elaboración de conservas.

Los datos obtenidos se han contrastado con latas de referencia (control) realizadas por en esta tesis. Las latas seleccionadas fueron las de la segunda experiencia en las que se empleó un binomio tiempo-temperatura de 115°/40 min, a día 0.

CASO 2. Estudio de idoneidad de conservas de sardina tras etapa de producción industrial. Se presenta un caso real de producción por una empresa importante del sector, donde se aplican los parámetros de control de calidad (aminas biógenas, catabolitos del ATP, TBA, BVT) para materias primas y conservas, en este caso de ejemplares de talla pequeña, *sardinilla*, que son contrastando con los valores de conserva de referencia elaborada a día 0, 115°C durante 40 min, en este trabajo.

Para el control estándar de conservas, se aplica la siguiente legislación:

- REGLAMENTO (CEE) 2136/89, de 21 de junio (DOCE L 212, de 22.07.1989) por el que se establecen *normas comunes de comercialización para las conservas de sardinas*.

- Modificado -establece normas de comercialización de las conservas de los productos tipo sardina en la Comunidad- por Reglamento (CE) 1181/2003, de 2 de julio (DO UE L 165, de 03.07.2003).
 - Modificado -artículo 1 bis, apartado 2, se añade una nueva especie a las autorizadas para la elaboración de conservas de productos análogos a las sardinas, y 7 bis- por . Reglamento (CE) 1345/2008, de 23 de diciembre (DO UE L 348, de 24.12.2008).
- TEXTO CONSOLIDADO REGLAMENTO (CEE) 2136/89 a 31.12.2008.





RESULTADOS Y DISCUSION





4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. DATOS BIOMÉTRICOS Y DE COMPOSICIÓN ELEMENTAL DE LA SARDINA CAPTURADA ENTRE LOS AÑOS 1992 Y 1994, Y 2016.

Los datos biométricos y de composición nutricional o elemental de la sardina capturada durante el periodo de 1992 a 1994 se exponen las siguientes tablas. En la Tabla 17 se reflejan los valores individuales obtenidos durante el primer mes de análisis (mayo de 1992), con un total de 30 individuos sobre los que se realizó los estudios biométricos. En todos los meses de toma de muestras, los ejemplares capturados por la flota de cerco de Portosín, tanto durante la descarga y venta en lonja, presentaban una talla aparentemente homogénea, no observando en ningún momento cajas con individuos de tallas marcadamente (visual) diferentes.

La aplicación del test para evaluar el tamaño mínimo de muestra a los datos anteriores, nos indica que con 13 individuos es suficiente para obtener un valor medio representativo de los ejemplares en cuanto a tamaño y peso, y que será la pauta a seguir en próximos ensayos. El Rendimiento representa el porcentaje medio obtenido de la parte comestible (peso eviscerado, en el cual se eliminan vísceras y cabeza) del pez con respecto a su peso total.

En la Tabla 18 se exponen los datos individuales del mes siguiente empleando 13 individuos para la obtención de los valores biométricos. A partir de esta toma de muestras, todos los datos biométricos obtenidos entre el año 1992-1994 y 2016, se realizan sobre un total de 30 individuos. En las Tabla 19 y Tabla 20 se exponen los valores medios obtenidos durante estos periodos.

Los valores expuestos representan una submuestra por lote de al menos 30 individuos, tomados al azar de diferentes cajas y palés.

Tabla 17. Datos biométricos de la sardina capturada el 27 de mayo de 1992.

Ejemplar	Peso (g)	Tamaño (cm)	Sexo	Peso eviscerado (g)
1	42,13	15,0	Indiferenciado	30,03
2	37,02	14,4	Indiferenciado	26,40
3	45,84	15,4	Indiferenciado	33,58
4	38,20	14,6	♂	26,68
5	40,85	14,9	Indiferenciado	30,06
6	41,82	14,4	Indiferenciado	30,48
7	44,23	15,7	♂	32,85
8	39,23	14,5	Indiferenciado	29,42
9	41,47	14,8	Indiferenciado	30,18
10	37,13	14,3	Indiferenciado	27,49
11	40,31	14,9	indiferenciado	29,90
12	41,65	14,7	Indiferenciado	30,62
13	39,41	14,9	Indiferenciado	28,54
14	37,51	14,6	Indiferenciado	26,87
15	42,53	15,0	♀	31,44
16	39,38	14,6	Indiferenciado	27,69
17	43,10	15,2	Indiferenciado	31,94
18	46,30	15,5	♂	33,84
19	43,69	15,3	Indiferenciado	31,98
20	44,32	15,2	Indiferenciado	30,78
21	34,74	14,1	Indiferenciado	26,01
22	34,43	14,4	Indiferenciado	24,85
23	43,30	14,6	Indiferenciado	31,44
24	38,12	14,6	Indiferenciado	27,52
25	39,41	14,9	Indiferenciado	28,36
26	41,47	14,9	Indiferenciado	29,93
27	43,33	14,9	Indiferenciado	30,92
28	37,08	14,3	Indiferenciado	27,11
29	43,68	15,1	Indiferenciado	32,08
30	38,44	14,6	Indiferenciado	27,75
MEDIA	40,67±3,05 g	14,81±0,38 cm		29,56±2,36 g

Rendimiento= 72,67±1,39 %

Tabla 18. Datos biométricos de la sardina capturada el 19 de Junio de 1992.

Ejemplar	Peso (g)	Tamaño (cm)	Sexo	Peso eviscerado (g)
1	45,12	15,1	Indiferenciado	31,44
2	50,98	15,5	Indiferenciado	34,46
3	58,59	15,2	Indiferenciado	39,97
4	48,43	15,4	Indiferenciado	33,62
5	52,28	15,6	Indiferenciado	35,25
6	60,70	16,4	♀	40,76
7	48,41	14,6	Indiferenciado	32,85
8	51,32	15,2	Indiferenciado	34,72
9	57,47	15,6	Indiferenciado	36,59
10	57,57	16,0	♂	38,62
11	52,38	15,7	Indiferenciado	34,85
12	48,23	14,7	Indiferenciado	30,97
13	53,21	15,2	Indiferenciado	36,62
MEDIA	52,67±4,69 g	15,4±0,47 cm		35,44±3,02 g

Rendimiento= 67,33±1,76 %

Tabla 19. Datos biométricos medios de la sardina capturada entre el año 1992 y 1994.

Mes/AÑO	Peso (g)	Tamaño (cm)
Mayo/92	40,67± 3,05	14,81±0,38
Junio/92	52,67± 4,69	15,40±0,47
Julio/92	49,84± 5,40	15,32±0,55
Agosto/92	33,98± 8,53	13,63±0,95
Septiembre/92	19,78± 2,73	11,29±0,43
Octubre/92	83,93±17,60	18,25±1,37
Mayo/93	52,03± 9,48	16,06±0,84
Junio/93	59,32±11,56	16,59±1,31
Julio/93	60,47± 9,20	16,48±0,90
Septiembre/93	64,68±10,69	16,44±0,65
Octubre/93	54,68±14,81	15,91±1,27
Noviembre/93	70,84±19,33	17,17±1,32
Diciembre/93	39,29± 7,74	14,59±0,77

Mes/AÑO	Peso (g)	Tamaño (cm)
Enero/94	26,99± 4,85	13,26±0,82
Marzo/94	58,01±15,28	16,73±1,4
Abril/94	58,64± 9,83	16,83±1,05
Mayo/94	69,14±10,75	16,8±0,69
Junio/94	80,81± 7,44	17,35±0,50
Julio/94	59,14± 9,45	16,51±0,68
Agosto/94	83,95±12,89	17,14±0,91
Septiembre/94	84,61± 7,54	17,83±0,52
Noviembre/94	20,34± 3,91	11,99±0,73

Los estudios científicos de composición al respecto, y para ciertas especies en concreto (especialmente las que fluctúan a lo largo de su ciclo vital como en este caso), indican que la composición además varía con la talla (Krzynowek y col., 1992; Ganas y col., 2007; Fernandes y col., 2014.).

Por lo general, la pauta es que a talla más pequeña, la tasa de grasa es menor. En este caso, la población capturada depende del azar, si bien, es conocido que en las épocas de freza, cuando desaparece la sardina grande (>15 cm) a nivel pelágico de la columna de agua, predominan los alevines (invierno-primavera), con tallas por debajo de los 15 cm, por ejemplo (diciembre-marzo). En el resto del año, predominan las tallas grandes, ideal para alguno de los objetivos de esta tesis (elaboración de conservas), a excepción de casos puntuales como en agosto-septiembre/92, noviembre/94 y septiembre/2016.

Tabla 20. Datos biométricos medios de la sardina capturada el año 2016.

Mes	Peso (g)	Tamaño (cm)
Marzo/2016	21,2± 9,0	12,07±0,45
Mayo/2016	81,1±11,3	17,45±0,11
Junio/2016	73,4±12,7	16,63±0,08
Julio/2016	71,1±10,3	16,34±0,21
Agosto/2016	68,6±18,9	16,03±0,12
Septiembre/2016	38,4± 6,4	13,58±0,53
Octubre/2016	92,6±13,3	18,84±1,60
Noviembre/2016	93,8±13,4	18,96±0,71

Así, en la Tabla 21 y Tabla 22, se muestran los valores medios del análisis elemental de las muestras durante el periodo 1992-1994, y durante 2016, donde además se realiza un estudio del perfil de ácidos grasos a lo largo del ciclo vital de esta especie.

Tabla 21. Composición elemental de la sardina capturada entre el año 1992 y 1994.

Mes/AÑO	Humedad*	Proteína*	Grasa*	Cenizas*
Mayo/92	71,62±0,98	21,39±1,13	4,97±1,21	1,49±0,10
Junio/92	69,22±1,44	18,85±0,55	6,73±1,80	1,57±0,08
Julio/92	64,88±1,42	19,36±0,46	13,36±2,08	1,48±0,04
Agosto/92	66,64±1,69	19,89±1,02	10,77±1,89	1,55±0,07
Septiembre/92	69,90±0,54	18,02±0,50	6,82±1,01	1,49±0,06
Octubre/92	60,56±1,58	18,44±0,20	5,16±2,05	1,93±0,27
Mayo/93	72,11±1,45	21,22±0,38	4,27±1,51	2,34±0,26
Junio/93	72,86±1,08	19,38±0,78	7,33±1,78	1,43±0,04
Julio/93	66,85±1,32	19,07±1,11	13,34±3,02	1,64±0,04
Septiembre/93	61,72±2,57	18,60±0,71	16,23±1,44	2,01±0,16
Octubre/93	64,92±2,16	21,42±0,78	11,91±0,58	2,01±0,15
Noviembre/93	66,37±1,45	19,23±0,10	11,15±2,44	1,98±0,09
Diciembre/93	74,29±0,19	19,60±0,19	3,39±0,30	2,03±0,36
Enero/94	78,33±0,22	19,66±0,44	1,12±0,10	1,94±0,12
Marzo/94	78,33±0,47	17,21±1,21	2,81±0,43	1,96±0,10
Abril/94	75,70±0,22	18,63±1,02	3,24±0,10	1,91±0,05
Mayo/94	66,29±0,19	19,70±0,56	12,50±0,69	1,47±0,03
Junio/94	61,42±1,12	20,36±1,34	17,04±1,86	1,48±0,09
Julio/94	62,27±0,04	19,02±1,06	16,82±0,10	1,33±0,09
Agosto/94	56,84±0,72	18,32±2,13	24,60±0,84	1,31±0,10
Septiembre/94	58,24±0,13	20,37±0,84	21,05±0,52	1,40±0,10
Noviembre/94	71,87±0,81	23,44±0,53	5,22±0,88	1,75±0,19

(*) expresado en %.

Tabla 22. Composición elemental de la sardina capturada el año 2016.

Año 2016	Marzo	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiemb	Octubre	Noviemb
Humedad ^a	77,1±1,1	75,3±0,7	73,2±1,0	70,0±0,5	68,4±1,6	61,1±2,3	63,2±1,2	63,5±1,7
Proteínas ^a	19,3±0,4	22,1±0,6	20,3±0,6	21,4±0,5	19,4±0,8	20,8±1,0	20,0±0,5	21,3±0,5
Grasa ^a	1,3±0,7	1,3±1,2	4,9±1,4	8,1±1,4	11,3±1,8	16,5±1,9	16,3±0,9	13,4±1,2
Cenizas ^a	1,91±0,05	1,53±0,12	1,64±0,21	1,71±0,07	1,45±0,11	1,51±0,17	1,63±0,04	1,71±0,08
Perfil de ácidos grasos ^b								
C12:0	0,2	0,0	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2
C13:0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C14:0 (Mirístico)	8,1	2,2	5,1	7,2	6,4	5,7	5,3	4,8
C14:1 (Miristoleico)	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1
C15:0	0,4	0,7	0,6	0,5	0,4	0,4	0,5	0,3
C15:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C16:0 (Palmitico)	15,1	17,3	19,9	17,1	18,8	19,4	17,3	17,1
C16:1T	0,2	0,3	0,4	0,5	0,3	0,3	0,4	0,5
C16:1 (n-7+n-9)	9,5	3,1	3,7	8,4	9,1	7,8	5,1	5,3
C17:0 (Margarico)	0,4	1,9	1,0	0,7	0,5	0,6	1,3	1,0
C17:1 (Margaroleico)	1,5	1,0	0,6	1,2	1,2	1,0	1,0	1,1
C18:0 (Estearico)	3,2	6,6	4,0	3,3	3,8	4,3	3,8	3,1
C18:1T (Oleico-trans)	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,4	0,1	0,1
C18:1n-9 (Oleico)	3,7	27,0	11,3	5,3	11,1	13,4	11,7	11,9
C18:1n-7 (Vaccénico)	3,5	0,0	0,0	2,8	3,8	4,1	0,0	0,0
C18:2T (Linoléico-t)	2,4	0,4	0,6	1,8	3,0	2,5	0,6	0,8
C18:2n-6 (Linoléico)	1,0	8,0	2,1	0,7	0,7	2,6	2,2	1,9
C18:3n-6 (Gamma)	0,0	0,2	0,1	0,3	0,4	0,5	0,1	0,1
C20:0 (Araquídico)	0,3	0,4	0,3	0,4	0,3	0,3	0,9	0,9
C18:3T (Linolénico-trans)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,2	0,2
C18:3n-3 (Linolénico-ALA)	0,3	0,5	0,7	0,3	0,3	0,5	0,9	0,6
C20:1	0,2	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	3,6	2,6
C18:4n-3 (Morotico)	0,0	1,9	3,5	5,0	2,5	1,3	0,2	0,2
C21:0	1,2	0,4	2,0	1,3	1,7	1,6	2,1	2,2
C20:2	0,1	0,4	0,0	0,1	0,2	0,1	0,3	0,3
C20:3n-6	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,2	0,3	0,2
C20:3n-3	4,4	2,8	7,0	7,6	2,8	1,7	4,7	3,1
C23:0	0,7	0,7	1,0	0,7	0,8	0,7	1,0	0,9
C22:2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3	0,6	0,1	0,0
C20:5n-3 (EPA)	22,5	4,0	8,5	15,5	17,4	18,1	9,8	13,8
C24:0 (Lignocérico)	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0
C24:1 (Nervónico)	0,3	0,5	0,9	0,8	0,6	0,8	1,0	0,9
C22:4n-6 (DTA)	0,2	1,4	0,5	0,2	0,2	0,2	0,5	0,5
C22:5n-3 (DPA)	2,5	0,9	1,5	2,1	2,0	2,0	1,7	2,1
C22:6n-3 (DHA)	11,6	16,7	21,6	11,0	6,6	9,6	16,8	14,6
Saturados	29,8	30,2	33,7	31,3	33,0	33,0	32,4	30,5
Monoinsaturados	18,8	33,4	21,6	16,9	28,5	26,4	23,1	22,5
Poliinsaturados	43,2	34,9	42,0	45,0	31,4	35,4	38,4	38,4
Omega - 3	41,7	24,9	39,1	41,5	29,5	31,5	34,1	34,4
Omega - 6	1,5	10,0	2,9	1,6	1,6	3,3	3,1	2,7
EPA+ DHA	34,1	20,8	32,0	26,5	24,0	27,7	26,6	28,4
Trans	2,7	0,7	1,0	2,4	3,5	3,1	1,3	1,6

(a) expresado como g/100 g de músculo; (b) como % del total de lípidos

Como se comentó anteriormente, la principal variación de la composición se halla en la humedad y la grasa, que evolucionan en el tiempo de forma inversamente proporcional, mientras que la tasa de proteína se mantiene constante, en torno a los 20 g/100 g, así como las cenizas (que incluyen sales minerales, incluidas pequeñas espinas intramusculares) en torno al 1,5%, aunque muestra diferencias significativas según mes de toma de muestras (entre 1,3 y 2,0 %). Respecto a la presencia de cenizas (sales de calcio, sodio, ..) es muy variable, y en nuestra opinión no está condicionado por el ciclo vital, dependiendo más de la preparación de la muestra, esto es, de las posibles escamas y espinas (abdominales, de la base de las aletas), que debido a su pequeño y delgado tamaño, puede incrementar estos bajos niveles.

En la Imagen 46 se representa la composición elemental de acuerdo con los meses de toma de muestras durante el año 1992 para visualizar mejor estas diferencias significativas, a modo de ejemplo, y que responde de forma general a un aumento de la tasa de grasa desde el invierno para alcanzar su máximo hacia finales de verano y descender a niveles nuevamente de hasta el 1% de grasa. En la Imagen 47, se elimina la humedad de la gráfica anterior que impide una mejor visualización de este fenómeno, incorporando además la evolución del OTMA como un compuesto nitrogenado no proteico habitual en su composición inicial. Este compuesto será reducido a TMA principalmente por vía bacteriana en condiciones de refrigeración, y que aportará al pescado el típico olor desagradable (Triqui y Bouchriti, 2003), mientras que en pescado congelado domina una acción autolítica mediante una demetilasa presente en músculo, generando DMA y FA (Sikorski y Kostuch, 1982), si bien, en estado fresco y refrigerado se generan cantidades menores de DMA. Se puede observar como su tasa disminuye desde los 13 mg N OTMA/100g a finales de la primavera, para descender significativamente hasta la mitad en agosto, en torno a los 6 mg/100g.

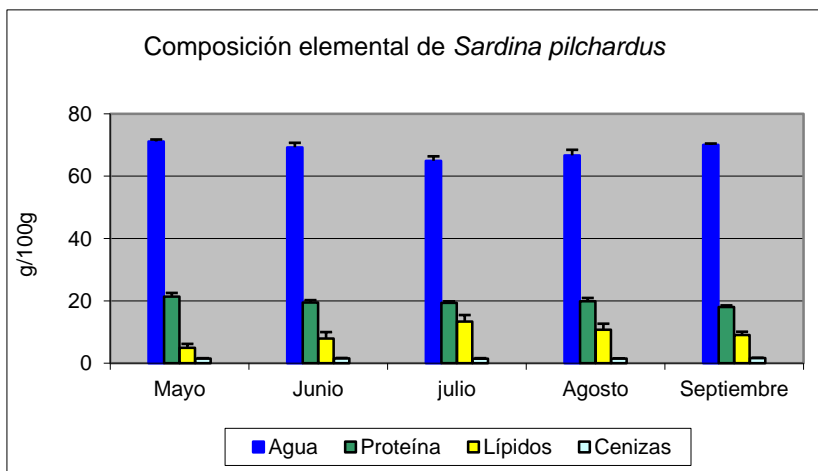


Imagen 46. Composición elemental de sardina a lo largo del año 1992.

En cuanto al contenido de OTMA, su presencia en el pescado está considerada como mecanismo de osmoregulación para poder sobrevivir en el medio salino, pero la tasa corporal varía a lo largo de su ciclo vital como muestran los resultados de esta tesis. Los estudios de posibles variaciones estacionales de este compuesto químico en pescado, y en concreto en sardina, son escasos, como en el caso de jurel *Trachurus mediterraneus* (Tzikas y col., 2007). Se asume que el contenido está directamente relacionado con la dieta de las especies pesqueras, siendo mayor en especies demersales de larga vida (Agusstson y Strom, 1981; Fernández-Salguero y Mackie, 1983, Shakila y col, 2003; Herland y col., 2009). Strom (1979) demostró que crustáceos copépodos, componentes del zooplankton marino, oxidan la TMA (que se halla presente en muchas especies del fitoplancton), y que su tasa de conversión es diferente de acuerdo con el ciclo vital, siendo mayor en primavera, e incluso diferente entre especies del mismo género (*Calanus spp*), lo cual sugiere una actividad enzimática diferente. La síntesis a pequeña escala de OTMA ha sido observada en el hígado y riñón del bacalao, si bien su mayor presencia en el músculo se debe a su ingesta a través de la dieta (Agustsson y Strom, 1981). Herland y col. (2009) observaron que en el caso del bacalao (*Gadus morhua*), los niveles de OTMA son mayores en ejemplares

salvajes que en cultivados, lo cual se asocia a la alimentación natural del primero. En el caso de los ejemplares cultivados, y que no se observó en el salvaje, el bacalao hembra acumula más OTMA muscular que los machos, y en este caso se asocia al mayor índice hepatosomático que presenta la hembra.

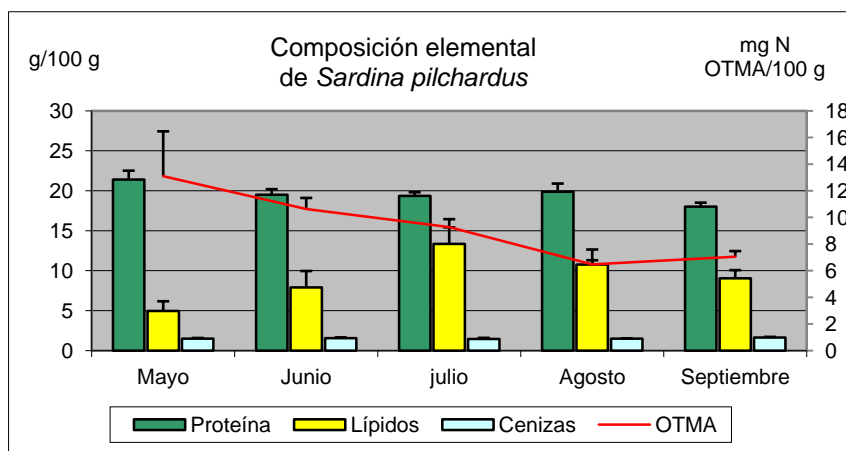


Imagen 47. Composición elemental (sin considerar humedad) y contenido en OTMA (expresado como mg N OTMA/100g) de la sardina a lo largo del año 1992.

Durante estos 4 años del estudio de la composición elemental a lo largo del ciclo vital de la *Sardina pilchardus*, podemos ver como incluso la tasa de grasa fluctúa según el año, tal y como aprecio Herrera y Muñoz (1957) para esta especie en el mar Mediterráneo (pero con un perfil aserrado en el tiempo, resaltando el diferente método analítico y tratamiento de las muestras), e incluso varía su máximo observado según el año (Imagen 48). Pero es preciso indicar la diferencia de tallas de los ejemplares capturados en cada año; así, durante el mes de julio, la talla es similar, con una media de 15.3, 16.5, 16.5 y 16.3 cm para los años 1992, 1993, 1994 y 2016, respectivamente, con una tasa de grasa dispar significativamente en 2016 (8,1%) respecto a años anteriores (sin diferencias significativas). Mientras que en septiembre, la talla fue más dispar, con 11.3, 16.4, 17.8 y 13.6 cm, para unas tasas de grasa de 6.8, 16.2, 21.1 y 16.5% para los años 1992, 1993, 1994 y 2016, respectivamente,

significativamente diferente para el año 1992 y 1994, respecto al grupo que representan el 1993 y 2016.

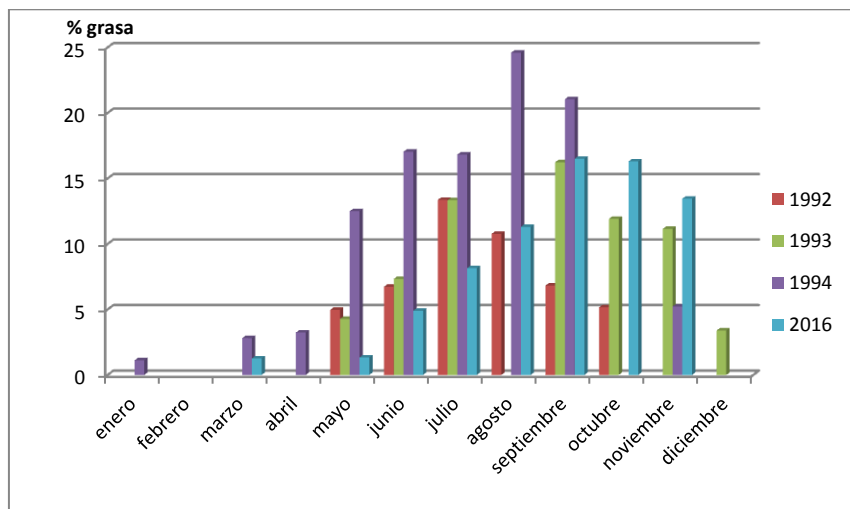


Imagen 48. Comparación de la tasa de grasa a lo largo del ciclo vital en los años de estudio.

De hecho, Caponio y col. (2004) indican que la mayor tasa de grasa de *Sardina pilchardus* depende proporcionalmente del tamaño, mientras que los ácidos grasos poliinsaturados dominan según el sexo, en este caso, mayor en machos. En el caso del Mar Mediterráneo, de acuerdo a los datos de Sánchez y col. (2013), el máximo de grasa acumulado se da en primavera (entre 2012-2013) o primavera a principios de verano (Zlatanov y col., 2007). Boudier y col (2011) obtienen una tasa de grasa para sardina mediterránea del 2,5% en febrero y 11% en Junio, pero no observa diferencias en sus componentes grasos según la zona de captura en un radio próximo (sólo a nivel de determinados minerales). Por otro lado, Munshi y col., (2005), sin citar la especie metodología, indica que para sardina de aguas tropicales, la tasa grasa es constante, en torno a 13%. Sin embargo, en aguas frías Atlánticas, las variaciones de grasa en sardina (Bandarra y col., 1997) y especies pelágicas afines como el arenque (Henderson y Almater, 1983) tienen lugar entre verano y otoño, con

variaciones entre años, como en este trabajo, con un máximo observado en 1994 de un 24%, y un 13% en 1992.

Las diferencias de la grasa radican en la variación de la composición de ácidos grasos, principalmente, observando un incremento de los ácidos grasos de la familia omega-3 en verano, donde el DHA y EPA suponen el 35% del total (25 y 10%, respectivamente). . En aguas de Japón, con *Sardinops melanostictus*, el máximo de grasa (7%) se alcanza entre julio-septiembre (Shirai y col., 2002), como en nuestro caso.

Dado los escasos estudios a este respecto, estos niveles máximos de grasa podrían responder a cambios climáticos u oceanográficos, relacionados con el tipo, cantidad y calidad de plancton del que se alimenta esta especie, además del hábitat o área geográfica, tamaño del ejemplar, de la disponibilidad de alimento, ... (Gómez-Guillén y col., 1996; Gökodlu y col., 1998; Costalago y Palomera, 2014), pero obviamente la evolución de la grasa y el máximo que alcance es diferente en cada año. La menor tasa observada entre invierno y primavera correspondería a 3 meses de desove en la zona de la costa noreste del Atlántico, tal y como han descrito Stratoudakis y col. (2007) para esta especie. También Herrera y Muñoz (1957) correlacionan este menor contenido graso al máximo desarrollo gonadal. En cualquier caso, para nuestras aguas, Bandarra y col. (1997) ofrecen unos datos similares a los conseguidos en esta tesis en 2016, con un máximo de grasa entre septiembre y octubre, tras el periodo de alimentación. Esta especie, en aguas templadas de las Islas Canarias, alcanza un máximo de grasa en junio, en torno a un 8,5 %, sin mostrar diferencias según el sexo (Lozano, 1990).

Esta grasa se acumula principalmente bajo la piel y en torno al músculo rojo u oscuro así como en la inserción de las aletas, tal y cual se observa en la Imagen 49.

En el caso de 2016, y para el caso de la sardina, la toma de muestras fue mucho más intensa, a partir de marzo de carácter mensual (desde diciembre 2015 hasta el 8 de marzo 2016 se decretó una veda para esta especie por parte de la Xunta de Galicia, lo que ha dificultado la adquisición de ejemplares), vuelve a mostrar un máximo de grasa entre septiembre y octubre (en torno al 17%).

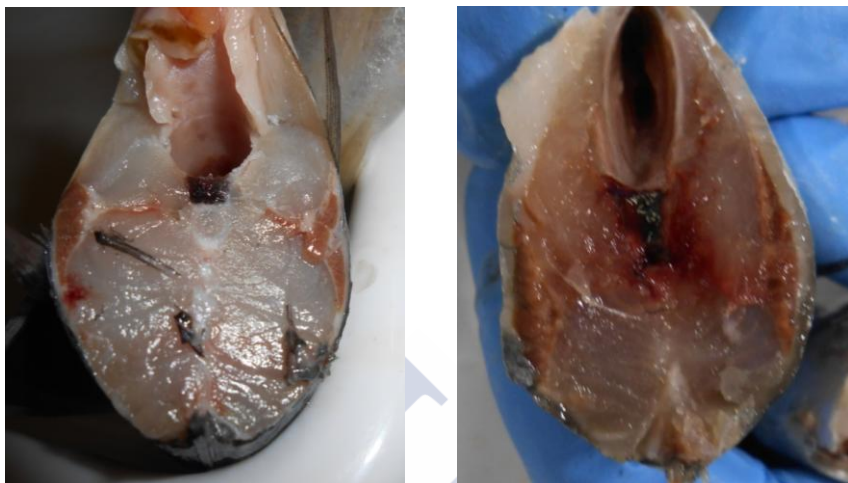


Imagen 49. Sección de sardina de Mayo 2016 (izquierda) donde se aprecia el cúmulo de grasa bajo la piel, y en Agosto (derecha), cuya capa es más gruesa.

En cuanto al estudio del perfil de ácidos grasos realizado en 2016, esta especie destaca en general por la presencia del ácido graso palmítico como ácido graso saturado principal, con unos niveles a lo largo de su ciclo vital en torno al 18% del total de lípidos, seguido por DHA y EPA, al igual que lo observado por Benguendouz y col (2017), seguido ya de cerca por el ácido oleico. Este último y el ácido palmítico, mantienen sus niveles estables a lo largo del periodo de estudio. En la sardina se observa una inversión en cuanto a abundancia en el porcentaje entre EPA y DHA, ácidos grasos reconocidos como cardiosaludables (de Ross y col., 2012). Pacetti y col (2013) sugieren que el DHA se concentra durante la época de prefreza en el músculo y las gónadas, aunque en nuestro caso, este aumento en el músculo se da entre mayo-junio, para descender hasta volver incrementarse en octubre, cuando se supone que la grasa pasa a formar parte del desarrollo gonadal.

En cualquier caso, en 2016, se observa una dominancia alterna de EPA y DHA, difícil de explicar este fenómeno, pero Bandarra y col (1997) indican una dominancia de EPA de mayo a diciembre, para invertirse con la dominancia de DHA hasta abril del siguiente año.

Chitra y Radhakrishnan (2013) han mostrado dominancia de estos ácidos grasos a lo largo del ciclo vital según la especie de sardina en aguas del océano Índico, en este caso, EPA domina sobre DHA en *Sardinella longiceps*, y el caso contrario para *Sardinella fimbriata*. Shirai y col (2002) sugieren que la tasa y tipo de ácidos grasos de *Sardinops longiceps* es similar al del plancton del que se alimenta para una misma estación, al tiempo que también han observado proporcionalmente un incremento de determinados aminoácidos libres (al igual que en el plancton), entre ellos la histidina, precursor de la histamina. En sardina capturada en otoño en la zona ártabra, su contenido graso ronda el 11% y los ácidos de la familia omega-3 se hallan alrededor del 30% sobre el total de ácidos grasos con un 20 y 10% de DHA y EPA, respectivamente (Brea-Fernández y col., 2012).

Por familias de ácidos grasos, en este trabajo predominan los ácidos grasos poliinsaturados (cerca del 40%), de los cuales en torno al 25-30% corresponderían a la suma de los conocidos como esenciales: EPA y DHA, seguido por el grupo de ácidos grasos saturados.



4.2. EFECTIVIDAD DE LA CONSERVACIÓN DEL PESCADO A BORDO CON AGUA DE MAR ENFRIADA.

El tamaño medio de los ejemplares (jurel) era de $37,2 \pm 3,4$ cm, con un peso medio de $480,6 \pm 42,3$ g, con un contenido graso medio de $4,6 \pm 1,1$ %. En el momento del comienzo de los análisis (tiempo 0), el grado de frescura es máxime, correspondiente a una categoría de frescura Extra, todos en pleno *Rigor-mortis*, tanto en su recepción en puerto de Portosín (transcurridas 2 horas tras su captura) como a su llegada a laboratorio (45 minutos de transporte). El grupo o lote constituido por los ejemplares tratados de forma tradicional por la flota de cerco se denomina como **lote H**, y el lote tratado a bordo con agua de mar enfriada se denomina **lote R**.

En la Imagen 50, se muestra la evolución térmica de la temperatura del pescado, mediante sondas *iButton*, pudiendo observar que el valor medio del pescado tratado con AME ha sido de entorno a $-1,4^{\circ}\text{C}$ en la zona inferior del tanque y $+0,8^{\circ}\text{C}$ en la capa superior (Imagen 51), frente a los $+9,1^{\circ}\text{C}$ que ha mostrado el pescado tratado de forma tradicional hasta bajar a los $8,2^{\circ}\text{C}$ en el mismo periodo de tiempo (este es el valor que muestran los ejemplares del centro geométrico de las cajas de pescado, de en torno a 16 kg/caja).

El aspecto de ejemplares AME y control se muestran en Imagen 52). Obsérvese en el ejemplar tratado con AME como mantiene parte de rigor mortis (elevación cola), mientras que el otro ejemplar tiene la cola caída (post-rigor). El ejemplar de AME posee una piel con mayor iridiscencia. En cualquier caso, y de acuerdo al baremo de la UE ambos tienen una categoría Extra. Tras introducir el pescado, el ambiente tarda en torno a 4 min en recuperar su temperatura manteniéndose en torno a los $-1,4^{\circ}\text{C}$, manteniéndose constante hasta el final del estudio. El pescado en AME alcanza a nivel de la columna la temperatura consigna en 16 min (en del fondo del tanque), mientras que el lote control, partiendo desde la misma temperatura ($+9,3^{\circ}\text{C}$) baja hasta los $+8^{\circ}\text{C}$ en el mismo tiempo.

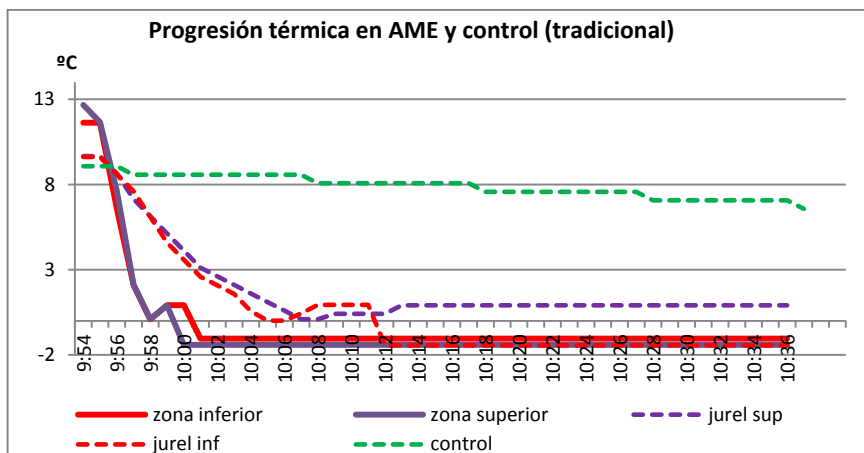


Imagen 50. Evolución de la temperatura ambiente (trazo grueso) y del interior del pescado (trazo punteado) con sistema AME frente a lote control (trazo punteado verde).



Imagen 51. Aspecto de la cuba isoterma AME con pescado tras su descarga en puerto.



Imagen 52. Aspecto del pescado control (abajo) y el enfriado con AME (arriba).

En la

Tabla 23 se exponen los valores medios del análisis sensorial de ambos lotes a lo largo del periodo de almacenamiento refrigerado con hielo y en cámara fría (4°C), ofreciendo los datos presentados por cada juez ($n=7$, aunque no todos los días) y su valor medio, expresado como Valor Q (Besteiro y col, 1993). En el momento de rechazo de cada lote, el factor determinante de acuerdo con el estudio de componentes principales (Tabla 24) ha sido principalmente el aspecto, peritoneo y olor de las branquias en fresco, y olor y sabor en cocido en el caso del lote H, mientras que en el lote R ha sido el aspecto en fresco, el olor y sabor en cocido. El límite de aptitud para lote control (H) se halla en 4 días, frente a los 6 días del lote R. Es decir, gracias al tratamiento AME (de apenas 2 horas), el almacenamiento posterior en hielo en el tiempo permite una ganancia de 2 días frente al tratamiento tradicional.

Tabla 23. Valoración personal del panel de cata (como Valor Q, juez 1 a 7), su valor medio y desviación estándar (std), a lo largo del tiempo de almacenamiento según el pescado ha sido tratado de forma tradicional (lote H) y en agua de mar enfriada o AME (lote R)

Lote	Día	1	2	3	4	5	6	7	Valor Q	Std*
H	0	2,99	3,00	2,99	2,98	2,98	2,99	2,99	2,99 ^a	0,00
	3	2,03	2,49	1,77	2,01	1,11	1,98		1,90 ^b	0,45
	5	0,87	0,80	1,11	0,49				0,82 ^c	0,26
	7	0,15		0,64	0,65		0,60	0,92	0,59 ^{cd}	0,28
	10	0,04		0,02	0,01		0,05	0,42	0,11 ^d	0,18
		1	2	3	4	5	6	7	Valor Q	std
R	0	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00 ^a	0,00
	3	2,12	0,95	1,57	1,99	0,78	2,05		1,58 ^b	0,59
	5	1,38	1,88	1,89	0,81				1,49 ^b	0,51
	7	0,65		1,08	0,76		0,53	1,68	0,94 ^{bc}	0,46
	10	0,32		0,76	0,44		0,60	0,98	0,62 ^c	0,26

Las letras en superíndice Valor Q indican diferencias significativas entre los días de cada lote. * Std, desv5ac5'6n estándar.

Tabla 24. Valor medio en el tiempo de los principales atributos sensoriales a tener en cuenta según PCA.

Día lote Hielo	Piel	Branquias	Peritoneo	Olor cocido	Sabor
0	2,17	2,67	3	3	3
3	2,17	2	1,5	1,89	2
5	1,17	1,33	0,67	1,42	0,5
7	0,67	0,83	0,5	0,78	0,33
10	0	0	0	0	0
Día lote R	Piel	Branquias	Peritoneo	Olor	Sabor
0	3	3	3	3	3
3	2	1,67	1,67	2,06	1,67
5	2	1,17	1	1,61	1,75
7	1,33	1	0,33	1,33	0,5
10	0,33	0,67	1	0,28	0,5

Un aspecto importante en resaltar como diferencia entre ambos lotes es la permanencia de todas las escamas dorsales en el caso de los ejemplares del lote R, mientras que en el lote tratado de forma tradicional por la flota de cerco (H), las escamas comienzan a desprenderse a partir del tercer día de toma de muestras gracias a la propia agua de lixiviación del hielo, y las que permanecen son fácilmente desprendibles durante su posterior manipulación.

Los ejemplares del lote R, fuertemente adheridas e imbricadas durante los primeros días, son ligeramente eliminables hacia el final del estudio, cuando son manipulados. Además, los ejemplares del lote R presentan una disposición tras la muerte diferente, mostrando un envaramiento por la zona dorsal que mantiene durante los primeros días, para adquirir una disposición ahusada típica hacia el final del estudio. Durante los primeros días, estos mismos ejemplares presentan las aletas en disposición de vida, es decir, con las aletas estiradas (Imagen 53). Los ejemplares del lote H, por el contrario, presentan desde el momento del comienzo de los análisis una disposición ahusada típica y que mantendrá hasta el final del estudio, con las aletas plegadas durante todo el experimento.

Durante la descarga de los ejemplares de ambos lotes en puerto, se realizó una pequeña prueba afectiva con 6 compradores y 4 armadores ajenos al estudio y trato realizado a bordo. A este grupo de entrevistados se les consulto por qué caja pujarían un precio más alto. En todos los casos, optaron por la caja de ejemplares tratados con el sistema AME (lote R). En un primer impacto visual, a parte de las características mencionadas anteriormente respecto a las aletas, aspecto del cuerpo y escamas, el color de la zona ventral es blanco-plateado con un elevado grado de opalescencia y en la zona dorsal presenta un color verde-oscuro muy brillante e irisado. En el caso del lote H, estas características se hallan más atenuadas, a parte de presentar la mayoría de los ejemplares en su parte ventral zonas de color gris claro a oscuro, como dando aspecto de ser golpeados.



Imagen 53. Aspecto de jurel lote H (superior) y lote R (inferior) a día 0.

Es evidente, a modo real y práctico, el mejor aspecto que presentan los ejemplares tratados con el sistema AME (lote R) frente al trato tradicional (lote H) a día 0, hecho que confirmaron los profesionales del sector. En su opinión, el sistema AME mejora las condiciones comerciales del producto. Otra cosa es si este sistema mejora o incrementa el periodo de vida útil del mismo.

En la Imagen 54, se observa la progresión del Valor Q que adquieren los ejemplares tratados de forma tradicional y por AME a lo largo del periodo de almacenamiento. Durante los primeros días el valor que obtiene los ejemplares correspondientes a lote R es ligeramente superior a los del lote H, aunque se muestren diferencias significativas a lo largo del estudio; sin embargo, a partir del día 5, aunque la evaluación sensorial del lote R es ligeramente superior al H, podemos considerar ambos lotes por igual, si bien las características que devalúan la puntuación sensorial son diferentes en ambos lotes. Así, en el lote R, la permanencia de escamas en la piel, considerado como un efecto positivo en los primeros días, hace que el mucus situado por su parte inferior adquiera tonalidades amarillo turbias, que con el transcurrir del periodo de almacenamiento van a un tono pardo

opaco, lo cual deslució el aspecto de los ejemplares, sobre todo estos fenómenos son más patentes en su zona ventral. Todo lo contrario en el lote tratado de forma tradicional (lote H), el cuál, al perder con el tiempo las escamas por el agua de lixiviación, presenta un dorso más limpio, azul pálido (pérdida de iridiscencia) sin presencia de mucus amarillento, con lo cual su aspecto es más "limpio".

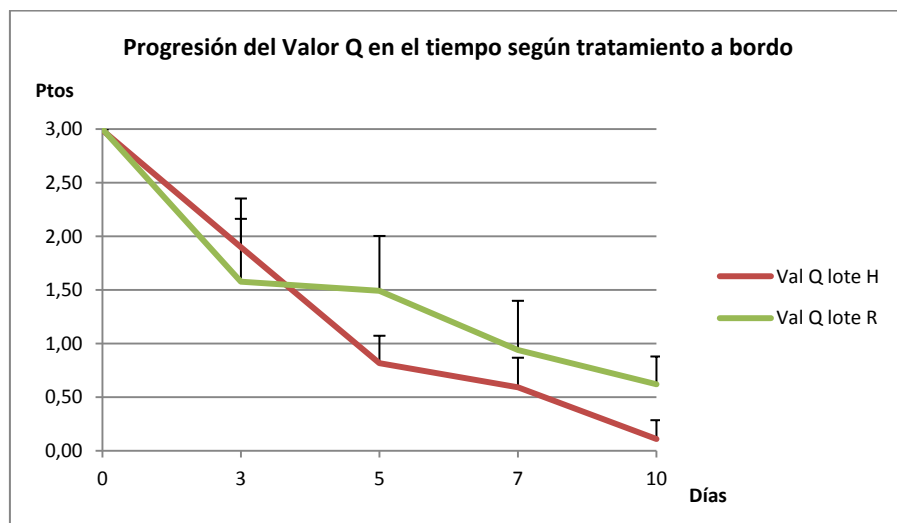


Imagen 54. Evolución del Valor Q de lote H y R a lo largo del periodo de almacenamiento en hielo.

Así, en el caso del lote tratado de forma tradicional a bordo (lote H), su vida útil es de 4 días frente a los 6 del lote R. En los gráficos siguientes (Imagen 55) se reflejan los valores puntuales de cada catador, observando la dispersión de valores del Valor Q en cada caso.

Dado que no se pudo contar para el estudio con todos los catadores, se replanteó el análisis sensorial teniendo en cuenta los catadores más frecuentes (catador 1, 3, 4 y 6) y así poder apreciar diferencias con el caso de contar de forma alterna con estos jueces, que se reflejan en los gráficos de la Imagen 56.

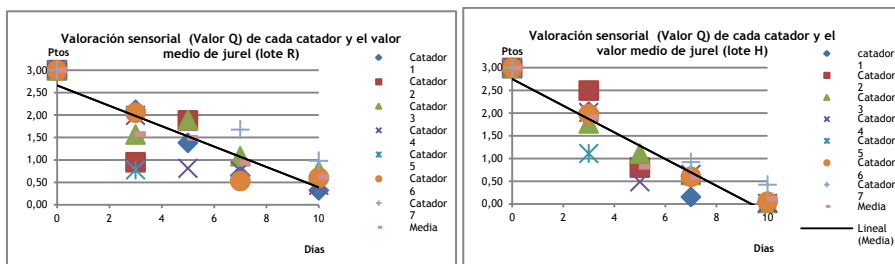


Imagen 55. Valoración sensorial del jurel según datos individuales del panel de cata (n=7) y tratamiento.

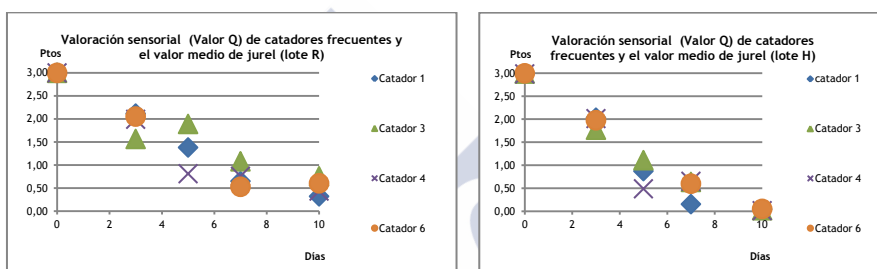


Imagen 56. Valoración sensorial del jurel según datos individuales del panel de cata reducido (n=4) y tratamiento.

Comparando la evolución media del Valor Q en el tiempo, los datos ofrecen una vida útil para el lote H de 4 días frente a los 6 días del lote R. En este caso, y como en el anterior, a medida que avanza el periodo de almacenamiento, no se observan diferencias significativas entre ambos lotes a excepción del día 10 (Imagen 57), cuando ambos lotes ya son rechazados. Por tanto, el número de jueces en este caso no influye en la determinación de su vida útil, pudiendo contar para otros ensayos con 4-5 jueces.

A parte de los fenómenos que tienen lugar en la superficie del pescado, ya en el día 3 de almacenamiento (Imagen 58), entre los atributos físicos que diferencian ambos lotes, los catadores destacan las branquias del lote R, que se presentan de color rojo oscuro y un olor entre neutro a ligero "a pescado". Mientras que el lote H, las branquias se muestran de color rojo pálido, deshinchadas con mucus grumoso blanquecino y olor patente "a pescado". El ojo del lote R,

ligeramente aplanado, con presencia de un cristalino grisáceo translúcido, pero aún con iridiscencia en la córnea, característica esta última que se pierde en el lote H.

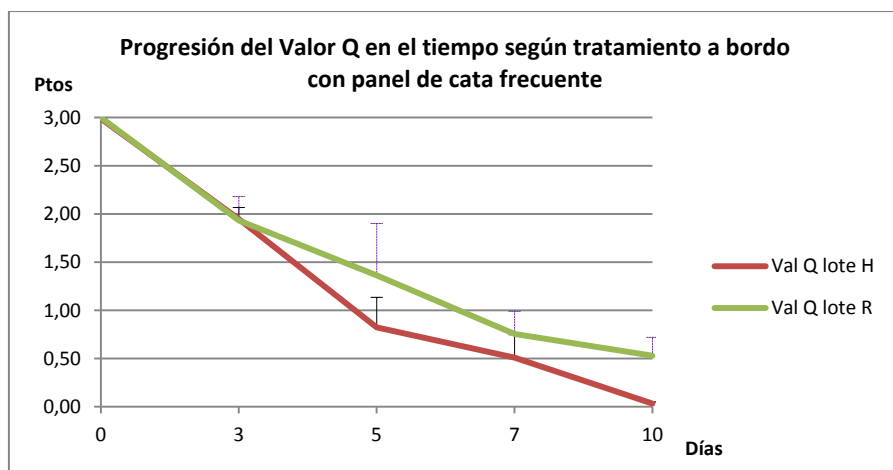


Imagen 57. Valoración sensorial del jurel a lo largo del tiempo de almacenamiento en hielo, según tratamiento, con un panel de cata reducido.

En el día 5 de almacenamiento en hielo, el lote R muestra un olor de las branquias típico "a pescado" (el cual es aceptable), mientras que en lote H, esta manifestación se acentúa acompañada de un olor amoniacal. En el día 7, las branquias de los ejemplares del lote R son de color rojo oscuro con mucus ligeramente blanco y olor fuerte a pescado (bajo el cual persiste un olor amoniacal), mientras que las branquias en los ejemplares del lote H, son de color naranja ladrillo y un fuerte olor amoniacal.

En cuanto a las características sensoriales que muestran los ejemplares durante las pruebas de cocción, las diferencias comienzan a ser patentes a partir del día 3, en cuanto textura, la cual es algo más blanda en las muestras del lote H, a parte de presentar un color blanco con brillo céreo; respecto a olor y sabor, aunque no se aprecian diferencias significativas entre ambos lotes en los primeros días, aparentemente el lote R conserva un olor y sabor característico a jurel siempre más fuerte que el lote H. A día 5, las primeras diferencias de

las cualidades sensoriales de las muestras cocidas son patentes en cuanto al olor, agrio en el lote R y rancio en el lote H, con un sabor dulzón en el lote R y el mismo pero con un postgusto astringente en el caso del lote H.



Imagen 58. Aspecto de jurel lote H (superior) y lote R (inferior) a día 3.

Ya en el día 7 (Imagen 59), las muestras del lote R presentan un olor agrio a ligeramente rancio, mientras que el lote H recuerda a sensaciones atribuidas "a pescado", es decir, amoniacales o a TMA. La textura en el lote R es seca y fibrosa mientras que en el lote H es muy blanda. En cuanto al sabor, mientras el lote R presenta unas características mejores (agrio en el postgusto), las muestras del lote H se manifiestan con un sabor picante, atribuible a sensaciones características a fenómenos ya patentes de autooxidación lipídica (rancio).



Imagen 59. Aspecto de jurel lote H (superior) y lote R (inferior) a día 7.

Como conclusiones al análisis sensorial, el jurel refrigerado se rechaza sensorialmente a día 4 en el caso del lote H, y al 6º día en el caso del lote tratado a bordo con AME (lote R).

En este ensayo, el olor rancio es una cualidad diferenciadora aparentemente, pero que debe ser contrastada por el aporte de los resultados químicos. Estos parámetros químicos son expuestos en la

Tabla 25 correspondiendo al estudio de TBA y generación de aminas volátiles y biógenas, y Tabla 26, donde se exponen los resultados del contenido de purinas y 5'-nucleótidos derivados del ATP.

En cuanto al índice de TBA (que cuantifica el MDA presente en el músculo como degradación de la fracción lipídica), existen diferencias significativas entre ambos lotes a lo largo del periodo de almacenamiento, alcanza un valor en el lote H en el límite de su aptitud sensorial de 1,91 mg/kg, frente a los 1,36 mg/kg del día límite para el lote R. Se muestra la correlación de la puntuación sensorial del olor (en este caso, mayor sensación o intensidad de rancidez se asocia a menor puntuación) frente al contenido de TBA, con un coeficiente de correlación alto en ambos lotes, 0,95 y 0,91 para lote H y R, respectivamente.

Las rectas de regresión obtenidas para cada caso son:

$$\text{LOTE H: } Y = -1,4558.X + 4,0823$$

$$\text{LOTE R: } Y = -0,7934.X + 2,4858$$

Así, este parámetro parece un adecuado para valorar el grado de deterioro del pescado fresco (jurel) independientemente del trato recibido a bordo, estableciendo unos valores límite de entre 1,3 y 1,5 mg MDA/kg.

No se puede asociar esta correlación en el caso de la generación de aminas volátiles. En el lote H, tras la captura y hasta el día 7, los valores se mantienen (en torno a 11 mg N-BVT/100 g) aunque con una tendencia a reducirse, para aumentar hacia el día 10 ($R^2=0,0031$), hasta los 12,36 mg/100 g. En el caso del lote R, sufre un ligero ascenso desde el día 0 hasta alcanzar los 13,16 mg/100 g a día 10 ($R^2=0,886$), aunque no se aprecian diferencias significativas con el lote H a lo largo del estudio. En este caso, el parámetro de BVT no parece un parámetro de control de frescura adecuado dado que influye por el tipo de tratamiento a bordo, y que asociamos a la presencia de escamas imbricadas, que protegen el músculo del agua de lixiviación del hielo durante su posterior almacenamiento. Hecho que justificaría

también el fenómeno observado para el caso del índice de TBA, donde los lípidos bajo la piel del pescado queda más expuesto en el caso del lote H frente al lote R.



Tabla 25. Valores medios (n=5) de índice de TBA, aminas volátiles (BVT, TMA) y aminas biógenas a lo largo del periodo de almacenamiento de jurel tratado de forma tradicional a bordo (H) y en AME (R).

Lote	día	TBA*	BVT**	TMA***	PUT ^a	TYR ^a	CAD ^a	HIS ^a	AGM ^a	FEN ^a	SPN ^a	SPA ^a
H	0	0,14±0,02	11,93 ±2,15	0,13±0,02	0,53±0,26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,79±0,11	6,65±0,96
	3	0,82±0,23	11,53 ±0,48	0,36±0,10	0,55±0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,01±0,63	7,39±2,31
	5	1,91±0,21	11,18 ±0,60	0,56±0,28	0,38±0,09	0,00	0,20±0,06	0,00	0,32±0,27	0,00	2,87±0,16	5,64±0,84
	7	2,76±0,46	10,9 ±0,63	1,02±0,20	0,54±0,12	0,00	0,42±0,24	0,00	0,73±0,31	0,01±0,02	3,02±0,07	7,13±0,42
	10	4,46±0,09	12,36 ±0,76	1,44±0,29	0,90±0,13	0,72±0,63	1,53±1,20	0,11±0,10	1,72±1,44	0,09±0,08	3,32±0,71	7,56±0,41
R	0	0,23±0,10	11,41 ±0,48	0,13±0,01	0,64±0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,09±0,88	7,55±2,21
	3	0,49±0,19	11,77 ±0,38	0,35±0,05	0,60±0,22	0,00	0,04±0,06	0,00	0,15±0,06	0,00	3,34±0,78	7,98±1,82
	5	1,49±0,73	11,85 ±1,20	0,78±0,36	0,60±0,17	0,00	0,18±0,10	0,00	0,23±0,17	0,00	3,46±1,03	7,20±2,09
	7	1,36±0,19	12,65 ±2,38	1,09±0,41	0,37±0,10	0,00	0,51±0,20	0,00	0,82±0,75	0,00	2,52±0,20	6,68±1,09
	10	2,29±0,18	13,16 ±2,42	1,21±0,19	0,34±0,06	0,00	0,60±0,13	0,00	0,71±0,34	0,00	2,70±0,27	7,41±0,84

(*), representado en mg DMA o TBARS/kg; (**) como mg N-BVT/100 g; (***), como mg N-TMA/100 g; (^a) como ug amina/g.

Tabla 26. Variación en el contenido de catabolitos de degradación del ATP (n=5) a lo largo del periodo de almacenamiento de jurel tratado de forma tradicional a bordo (H) y en AME (R)

lote	día	AMP*	IMP*	HxR*	Hx*	Σ total*	IMP**	HxR**	Hx**	Valor K _i **
H	0	0,08±0,03	4,33±0,20	0,19±0,07	0,03±0,01	4,54±0,28	95,33±1,45	4,04±1,28	0,63±0,17	4,67±1,46
	3	0,03±0,03	4,57±0,34	1,26±0,20	0,14±0,04	5,97±0,52	76,61±2,33	21,05±1,88	2,34±0,64	23,39±2,33
	5	0,01±0,02	4,07±0,22	1,74±0,40	0,30±0,02	6,12±0,22	66,69±5,64	28,35±5,72	4,97±0,40	33,31±5,64
	7	0,00	3,14±0,60	2,15±0,33	0,29±0,01	5,57±0,32	56,07±7,65	38,72±7,39	5,21±0,39	43,93±7,65
	10	0,01±0,01	2,28±0,16	2,47±0,63	0,40±0,10	5,15±0,65	44,75±5,61	47,5±6,79	7,74±1,74	55,25±5,61
R	0	0,08±0,03	5,13±0,01	0,17±0,04	0,02±0,00	5,32±0,03	96,36±0,79	3,18±0,76	0,46±0,03	3,64±0,79
	3	0,02±0,00	4,68±0,75	1,36±0,23	0,12±0,05	6,16±1,02	76,05±0,46	22,1±0,03	1,85±0,43	23,95±0,46
	5	0,02±0,00	3,38±0,81	2,09±0,13	0,23±0,04	5,69±0,69	58,78±7,02	37,08±5,95	4,14±1,08	41,22±7,02
	7	0,01±0,00	3,22±0,38	2,16±0,19	0,36±0,06	5,74±0,38	55,97±3,46	37,66±3,97	6,38±1,21	44,03±3,46
	10	0,01±0,01	2,45±0,16	2,63±0,21	0,40±0,05	5,48±0,08	44,74±3,51	48,03±3,08	7,23±0,95	55,26±3,51

(*) valores representados como μmol/g, (**) representados como % del sumatorio total de los 5'-nucleótidos y purinas presentes (Σ total). Valor K_i, como la relación de la suma de HxR e Hx, con respecto al sumatorio total de la cadena de catálisis desde ATP hasta Hx.

La TMA, una amina que integra parte del parámetro BVT, tampoco muestra diferencias significativas ($p>0,05$) entre ambos lotes a lo largo del almacenamiento, evolucionando de forma similar, con una generación de TMA baja.

En cuanto a la formación de aminas biógenas, en su máximo grado de frescura, día 0, el pescado ya presenta bajas cantidades de putrescina (PUT), y cantidades patentes de espermidina (SPN, en torno a 3 $\mu\text{g/g}$) y espermina (SPA, 7 $\mu\text{g/g}$); estas 2 últimas aminas no sufren modificaciones durante el almacenamiento en ambos lotes. La PUT sufre un ligero ascenso hacia el final del estudio en el caso del lote H, mientras que desciende ligeramente en el lote R, sin sobrepasar o alcanzar 1 $\mu\text{g/g}$ al final.

Destacar la presencia ya hacia final del estudio de histamina (HIS), tiramina (TYR) y β -feniletilamina (PHE) sólo en el lote H, con 0,11; 0,72 y 0,09 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. En las condiciones de almacenamiento refrigerado con hielo, sólo las aminas cadaverina (CAD) y agmatina (AGM) destacan como productos microbiológicos de interés. El lote H sobrepasa 1,0 $\mu\text{g/g}$ al final del periodo de estudio, tanto para CAD como AGM, 1,53 y 1,72 $\mu\text{g/g}$ a día 10, respectivamente. El lote R alcanza los 0,60 y 0,71 $\mu\text{g/g}$ para estas aminas a día 10, respectivamente, significativamente distinta según el tratamiento aplicado a bordo ($p<0,05$). Es obvio que la aplicación de AME retarda la invasión bacteriana y la tasa de formación de aminas se ralentiza en consecuencia.

Desde el punto de vista autolítico, la formación de catabolitos del ATP en el jurel tiende a acumular rápidamente IMP, entre los 4 y 5 $\mu\text{mol/g}$, con tasas bajas de AMP (ATP y ADP no se muestran ya que son valores prácticamente inexistentes, a nivel de trazas). Los niveles de IMP se mantienen prácticamente hasta el día 5, para empezar a descender significativamente en ambos lotes. En paralelo, a raíz del IMP se va formando lentamente HxR y con una tasa menor Hx, sin mostrar diferencias significativas entre estos 2 lotes de jurel, al igual que refleja el Valor K_i , que alcanza el 55% al final del estudio. En este caso, el diferente tratamiento a bordo no parece afectar la degradación autolítica del ATP (aunque por las condiciones de trabajo no ha sido posible ver que ocurre entre el ATP y AMP desde el arriado del

aparejo en el barco y el laboratorio, donde quizás, y por el tiempo transcurrido, es donde podrían apreciarse estas diferencias). En cualquier caso, en laboratorio las condiciones han sido constantes y similares para ambos lotes, lo cual explicaría una reacción enzimática de catálisis del IMP similar en ambos lotes. La diferencia térmica inicial de enfriado del músculo no ha afectado a la actividad enzimática *postmortem* relacionada con la cadena del ATP.

La Hx, cuya formación hacia los últimos días de almacenamiento del pescado se asocia a una conjunta actividad bacteriana y enzimática, en este caso no se aprecian estas diferencias, como ocurre con la generación de las aminas biógenas que vimos anteriormente, principalmente CAD y AGM, formación asociada a la invasión bacteriana del músculo. En cualquier caso, el valor de Hx en el límite de aptitud sensorial ronda el 5% sobre el total de catabolitos del ATP, o 35-40% para el caso del valor K_i .

Diversos autores han estudiado el efecto de diferentes tratamientos durante el enfriado a bordo o en tierra para preservar el jurel frente a la oxidación durante su posterior tratamiento congelado (Medina y col., 2009). El empleo de ácidos orgánicos como cítrico, ascórbico y láctico (Sanjuás-Rey y col., 2011), con dosis del 0,005 y 0,02%, han resultado eficaces en prevenir la autooxidación en un jurel con hasta 2,5% grasa en su composición, tal y como reflejan los datos de TBA (1,2 ppm MDA en 0,02% frente al control 1,6 ppm, a día 13) e índice de peróxidos, a lo largo de 13 días de almacenamiento refrigerado (hielo 1:1 y en cámara fría +4°C). Si bien, comprobaron que estos ácidos no tienen efecto sobre el deterioro del ATP. El valor K aumenta progresivamente en los 3 lotes (día 7, 21-23%; día 13, 43-44%), al tiempo que el pH incrementa superando pH 7,0 a día 13. A día 11 se rechaza el jurel control y a día 13 el tratado con 0,02% ácido.

En otro ensayo con jurel 0,6-2% grasa (Aubourg y col., 2002), al cabo de una semana en hielo, la TBA aumenta significativamente desde 0,1 ppm hasta los 0,6 ppm MDA, incremento que se reflejará posteriormente en estado congelado. Desde un punto de vista sensorial, el olor rancio en producto cocido se manifiesta intensamente a partir del 3° día, con 0,4 ppm MDA, y que se mantendrá e intensificará en el producto congelado, siendo rechazo al 5° día. Existe

pues una buena correlación entre olor a rancio y el valor de TBA y Peróxidos.

Lehmann y Aubourg (2008) muestran como el eviscerado influye en la velocidad de oxidación lipídica durante 12 meses en estado congelado (se rechaza al 7º mes por sensaciones rancias, con 0,8 ppm MDA). Por tanto, a pesar de mejorar el deterioro autolítico, la evisceración favorece la oxidación no enzimática.

Si bien, el uso de sal o salmuera previo a la congelación, o durante ésta, para especies pequeñas grasas como caballa (7% grasa) y jurel (7,6% grasa) no es recomendada (Aubourg y Gallardo, 2005a). La sal aumenta en el músculo frente al sistema de congelación tradicional, mejorando la textura, pero el PV y TBA aumentan durante el almacenamiento en caballa, mucho mayor que en jurel, pero en ambos casos, siempre superior al sistema tradicional, con un rechazo sensorial al 5º mes por sensaciones rancias en olor y color amarillento, principalmente. El aspecto de presentación del pescado es importante, con mayor tasa de autooxidación (PV y TBA) en el caso de filetes que el pescado entero (caballa) y mayor si el pescado posee más grasa (noviembre 6,5-10% vs mayo 1-3,5%) (Aubourg y col., 2005b). La sal se ha citado como prooxidante por quelar los iones Fe del músculo (Kanner y col., 1991), fenómeno que observaron otros autores (Saito y Udagawa, 1992; Davis y col., 1993).

Durante la refrigeración en hielo, de especies donde puede existir un control mayor que en especies salvajes, como el rodaballo de acuicultura (Aubourg y col., 2005c), durante 30 días de almacenamiento refrigerado, con 0,8-1,2% grasa, los especímenes mantienen hasta el día 14 una categoría de frescura clase A, e inaceptables a día 20, siendo limitante el aspecto y olor del mucus, vida útil muy similar a otros especímenes de gran tamaño como merluza, especie magra (Ruiz-Capillas and Moral, 2001) o túnidos, especie semigrasa (Pérez-Villareal and Pozo, 1990). En cuanto al componente graso, se evalúa la tasa de ácidos grasos libres (FFA), que presentan un leve incremento hasta los primeros 15 días, para después mantenerse, y PV, que apenas se observan diferencias en el estudio. Por tanto, los mecanismos de autooxidación y su respuesta son mucho menos importantes que en el caso de especies grasas (Undeland y col.,

1999, Aubourg y col., 2002, Aubourg y col, 2005b). Una especie magra en estado salvaje, que en acuicultura pasa a ser semigrasa, la lubina por ejemplo (con 4% grasa), posee en almacenamiento en hielo una vida útil de 15 días (Grigorakis y col., 2004), cuando presenta valores de TBA de 1,6 ppm, pero sin relacionar a sensaciones a rancio, pero sí a olores típicos de alteración bacteriana, cuando la flora dominante, aerobia (*Pseudomonas spp*) favorece el desarrollo de BVT (~20 mg N/100g). Su degradación muscular y sensorial ocurre más rápido en época invernal que en estival, principalmente debido al desarrollo de la flora bacteriana en invierno, aunque otros autores para dorada no observaron estas diferencias estacionales. López-Caballero y col. (2002) para dorada indican que la flora dominante y causante del rechazo del pescado son las bacterias productoras de H₂S.

El valor K en rodaballo en hielo (Aubourg y col., 2005c) se incrementa gradualmente hasta el día 19 (75%), manteniéndose hasta el final del estudio, aspecto extraño, dado que su valor debiera rondar el 100% al final del estudio, por degradación del IMP y/o HxR, al ser la actividad bacteriana más activa, tal y como algunos autores observaron en trucha de cultivo (Rodríguez y col, 1999) o lubina (Grigorakis y col., 2004), que ofrecen valores de 70% y 60% valor K en el límite de aptitud sensorial en condiciones similares, respectivamente. En ambos casos, el IMP desciende rápidamente los primeros días para hacerlo más lentamente hacia el final de los estudios realizados. En esta línea, en el caso de dorada, la forma de sacrificar los animales durante el almacenamiento en hielo, no influyen en los clásicos parámetros químicos de alteración en correlación al análisis sensorial (Tejada y Huidobro, 2002), al igual que el eviscerado, que sólo influye reduciendo la flora bacteriana inicial, pero durante el almacenamiento en hielo, su actividad no refleja diferencias en los parámetros químicos relacionados con el deterioro microbiano (TMA, BVT). La estacionalidad es la principal influencia en la calidad o frescura de los especímenes cultivados, no así el tamaño, con un deterioro autolítico más rápido en verano (valor K) pero el bacteriano es mayor en invierno (Grigorakis y col., 2003; Hurtado-Rodríguez y col., 2010).

La cría de ciertas especies, especialmente magras, ha conllevado a una alteración de su composición elemental natural, especialmente por un incremento de su tasa de grasa con respecto a su homólogo salvaje (*Sparus aurata*), destacando la presencia de monoénos, ácidos grasos n-9 y C18:2n-6, mientras que en las especies magras salvajes destacan ácidos grasos saturados, n-3 y 20:4n-6, con una mayor relación n-3/n-6, lo cual influye en la apariencia del pescado (Grigorakis y col., 2002). Lenas y col. (2011) indican algo similar para lubina (*Dicentrarchus labrax*) donde los ejemplares salvajes poseen 1,7% de grasa frente al cultivado (7,3%), acumulada especialmente en la zona perivisceral, con dominio de ácido linoleico (C18:2n-6) frente al DHA (C22:6n-3) del salvaje.

En general, el pescado salvaje posee más riqueza de n-3 y una relación n-3/n-6 mayor (ácidos grasos cardiosaludables), y mucho mayor durante el invierno (Ozyurt and Polat, 2006), lo cual se manifiesta con una textura más firme (Fuentes y col., 2010), que coincide con una relación de aminoácidos esenciales/no esenciales ligeramente inferior con respecto a otras épocas del año, pero que individualmente a penas muestran diferencias significativas como el perfil de ácidos grasos, dominan aspártico, glutámico y lisina en el salvaje, si bien en ejemplares cultivados su perfil aminoacídico dependerá de la alimentación.

En el caso del jurel salvaje en aguas mediterráneas (*T. mediterraneus*), su contenido máximo graso es en abril (5%) y un mínimo en septiembre (0,1%), observando también diferencias significativas en la flora bacteriana del pescado (*Pseudomonas spp*) en una misma zona de captura, pero que no es achacable a la época del año (Tzikas y col., 2007).

El uso de hielo líquido en sardina (*Sardina pilchardus*, con 7-7,3% grasa) a lo largo de 9 días frente a hielo en escamas tradicional, es adecuado para prevenir la autooxidación (Losada y col., 2007, Medina y col., 2009), previo a la congelación, lo cual favorece su aumento de vida útil durante el congelado, y cuanto más baja sea la temperatura mayor será su vida útil (Aubourg y col., 2004). El hielo líquido posee como ventaja:

- temperatura de almacenamiento inferior a 0°C,
- tasa de enfriado mayor por su mayor capacidad de intercambio térmico, c) daños físicos limitados por los pequeños tamaños de los cristales, y
- previene de la deshidratación superficial del pescado (Piñeiro y col., 2004).

Estos autores emplean 40:60 hielo:agua mar (3,3% sal), y temperatura -1 a -1,5°C frente al hielo escamas (+0,5°C), en proporción hielo/pescado 1:1 en ambos casos. La sal del músculo se incrementa 4 veces al cabo de 9 días en hielo líquido. La TBA aumenta con el periodo de enfriamiento (y con el congelado correspondiente, hasta 4 meses) en ambos casos, pero siempre menor en sardina tratada con hielo líquido (día 5, 0,47 ppm vs 0,53 ppm hielo tradicional), las muestras con hielo tradicional presentan claros indicios de rancidez tras 9 días.

El almacenamiento en hielo líquido (12 días) no afecta al grado de frescura del jurel frente al tratado con hielo en escamas, no encontrando diferencias significativas tampoco en la flora bacteriana, BVT y TMA, sólo se observan diferencias respecto a la estabilidad térmica (Schubring y Meyer, 2006), con resultados similares a los obtenidos en nuestro estudio.

Con el uso de hielo líquido durante varios días, el rodaballo puede mantenerse sensorialmente aceptable 33 días, en base a características externas, donde el principal factor para su rechazo ha sido el olor y color de las branquias, frente a 22 días con hielo tradicional, rechazado por el aspecto externo (mucus) y olor (Rodríguez y col., 2006). Las bacterias varían significativamente a partir del día 19, mayor su conteo en hielo tradicional ($>1,0 \times 10^6$ ufc/g), coincidiendo con un aumento del pH ($> 6,7$), de bases volátiles totales (BVT, supera los 25 mg/100g, mientras que con hielo líquido baja de 25 a 20 mg hasta día 40) y trimetilamina (TMA, 5 mg N/100g), parámetro químico que presenta un menor crecimiento. En el límite de aptitud, el contenido de TMA es de 11 mg N/100g en hielo tradicional vs. 15 mg N/100g en el caso de hielo líquido. El valor K aumenta rápidamente con las muestras conservadas en hielo tradicional, especialmente a

partir del día 9, alcanzando 70% al final del estudio, mientras que con hielo líquido sobrepasa ligeramente el 50% (33 días), pero es curioso que no se alcance un 100% de valor K para el hielo tradicional a partir del día 14, manteniéndose entre el 70-80% hasta el final del estudio (40 días), como si no se hubiese degradado el IMP, aspecto no comentado por los autores.

En el caso del jurel, el uso de hielo líquido mantiene la tasa de aerobios hasta el día 12 de almacenamiento, y el pH constante (6.5) hasta el final del estudio de 22 días, frente al hielo tradicional, donde la flora bacteriana aumenta desde el primer día superando el límite de 10^6 ufc/g a los 12 días, aumentando el pH desde el inicio del ensayo hasta superar 7,5, cuando las muestras son aceptadas sensorialmente hasta el día 15 días, vs a los 5 días de almacenamiento con hielo tradicional. A partir de este día es cuando los valores químicos se hacen significativamente diferentes en relación al lote con hielo tradicional, cuando se disparan los valores de BVT y TMA, con 25 mg N/100g y 2 mg N/100g en el límite de aptitud sensorial, respectivamente, frente a 26 mg N BVT/100g y 7 mg N TMA/100g en el límite de aptitud con el uso de hielo líquido (15 días), apreciando una correlación con los datos microbiológicos. No se observa una buena correlación de la TMA con el análisis sensorial, no considerándolo un buen parámetro de frescura, pese a que otros autores han opinado lo contrario para la misma especie (Aubourg, 2001). A pesar de ello y en base a los resultados, el uso de hielo líquido mejora el almacenamiento refrigerado y la explotación comercial del jurel.

Resultados similares y conclusiones se obtienen para el almacenamiento con hielo líquido durante 22 días de *Merluccius merluccius* entera (Rodríguez y col., 2004), cuya vida útil se establece en 12 días, en base a características externas, a pesar del enturbiamiento del ojo (dato negativo que esta tecnología lleva implícito), que en el caso del uso con hielo tradicional aparece en torno a los 15 días (Huidobro y col., 2001). Con hielo tradicional, la vida útil de merluza entera es de 8 días, corto si se compara con los 22 días en ensayos de Ruíz-Capillas y Moral (2001), donde la merluza se halla eviscerada. Los niveles de pH, TMA y BVT en hielo tradicional

se disparan significativamente a partir del 12º día, crecimiento dispar de estos parámetros a los mostrados por Baixa-Nogueras y col. (2002) para esta especie, pero en este caso eviscerada. Así, a día 15, la merluza entera presenta 5 mg N TMA/100g (límite propuesto como aptitud, Ludorff y Meyer, 1978) frente a los inferiores a 3 mg N TMA/100g para merluza eviscerada en el mismo periodo.

Estos trabajos recomiendan el uso del hielo líquido a bordo, al igual que las experiencias llevadas a cabo en el banco de Gran Sol con merluza *Merluccius merluccius*, juliana *Lophius piscatorius* y raya *Raja clavata* (Barros-Velázquez y col., 2008), banco donde trabaja una parte importante de la flota gallega, y que suele permanecer hasta 15 días para volver al puerto base. Como en otros casos, hacia el final del estudio se observan diferencias significativas entre sistemas de enfriado en las 3 especies, con menor producción de TMA, BVT y bacterias (psicrotróficas y proteolíticas) cuando se aplica hielo líquido, con una vida útil de 10 días para merluza, y 16 días para raya y juliana, con una tasa de BVT de 18.3, 43.9 y 16.9 mg N/100 g respectivamente. Los parámetros sensoriales definitorios o limitantes en la idoneidad del pescado cuando se usa hielo líquido son branquias y consistencia (merluza), ojo (juliana) y olor amoniacal y consistencia (raya), mientras que en hielo tradicional son consistencia (merluza), cavidad visceral (juliana) y olor amoniacal (raya). En el caso de la merluza, su vida útil con hielo tradicional ha sido baja (6 días) en relación a otros trabajos (20-25 días; Ruíz-Capillas y Moral, 2001; Baixa-Nogueras y col., 2002), y que los autores asocian al menor tamaño de los ejemplares utilizados.

Con lubina de cultivo se han realizado experiencias con hielo líquido en el momento de captura (1:1), manteniendo el pescado a +4°C. Su vida útil se establece en 11 días de almacenamiento en hielo líquido, superando el conteo bacteriano de 10^6 ufc/g a los 15 días; y 13 días para el caso de hielo tradicional (Cakli y col., 2006a). En cualquier caso, a partir de los 15 días los niveles de BVT sobrepasan los 35 mg N/100g, destacando desde un punto de vista sensorial que el ojo en hielo líquido es turbio y se aplana antes, y las branquias manifiestan antes mucosidad densa, turbia, por lo que se recomienda su uso sólo al momento de recoger o capturar el pescado y no

emplearlo largo tiempo, pues no mejora o compensa la vida útil de esta especie (Martinsdottir y col, 2002; Cakli y col., 2006b).

Similares conclusiones se indican para especies marinas de cultivo como el salmón (Erickson y col., 2011), con 40% grasa. Estos trabajos señalan que el hielo líquido no supone ventaja práctica o industrial frente al sistema de hielo en escamas (tradicional), al menos durante los primeros 12 días de almacenamiento refrigerado; más allá de este periodo, este sistema sí podría tener sentido al poseer un mejor estado sensorial, valores microbiológicos y químicos más bajos que el hielo tradicional.

Entre las desventajas del hielo líquido está la ganancia en peso (3-4,5%) y sal (0,5%) durante los primeros 15 días, las branquias poseen un color inferior al deseable, y menor capacidad de retención de agua, lo cual indica cambios en la estructura proteica y repercute en la textura del músculo. Por tanto, durante los primeros días, el hielo líquido no contribuye a mejorar la frescura de pescado entero o eviscerado, a pesar de mostrar una menor tasa de deterioro, como también observaron Waterman y Taylor (2001) en bacalao a -2/-3°C, sugiriendo su aplicación para productos finales, transformados, como filetes, para distribuir directamente a consumidores, combinando con atmósferas protectoras para mejorar su periodo de comercialización (Hansen y col., 2009; Digre y col., 2011).

Así, y en base a los resultados de nuestro trabajo, uno de los mejores parámetros estudiados para valorar la frescura del pescado en relación al análisis sensorial ha resultado ser el índice de TBA, así como la presencia de CAD y AGM, como indicadores de la invasión bacteriana del músculo, y su dominancia sobre el resto de aminos, indican correctas condiciones de almacenamiento, estos es, condiciones de almacenamiento cercano a 0°C. A pesar de finalizar el ensayo a día 10, con claros signos de alteración en ambos lotes, está claro el efecto positivo del uso de AME en los barcos frente al sistema tradicional, especialmente por la presencia de aminos como TYR e HIS, que despunta en el tratamiento a bordo tradicional, por lo cual está claro que afecta a la población bacteriana. Sin embargo, el estudio de los catabolitos del ATP no refleja diferencias entre ambos sistemas,

por lo que la degradación enzimática de este sistema, no se ve afectada inicialmente por el tratamiento de recepción del pescado a bordo.

4.3. ENVASADO Y ALMACENAMIENTO DE SARDINA EN ATMÓSFERAS PROTECTORAS (MAP). ESTUDIO DE VIDA ÚTIL.

4.3.1. Refrigeración I. Sardina envasada a vacío bajo refrigeración a +4°C.

Se contrastan los resultados físico-químicos y sensoriales obtenidos de la sardina entera almacenada en hielo (sistema tradicional, lote MH), frente al sistema más simple de envasado en MAP, esto es, evisceradas al vacío a +4°C (lote MV), y enteras a temperatura de refrigeración, en este caso +4°C (lote MA). Los ejemplares de partida (capturados en Mayo) poseían una talla media de $148,1 \pm 3,8$ mm y un peso de $40,67 \pm 3,05$ g individuo ($n=30$). Los ejemplares poseen una composición media de $71,10 \pm 0,56\%$ de agua, $21,39 \pm 1,13\%$ de proteína, $4,97 \pm 1,21\%$ de grasa y $1,49 \pm 0,10\%$ de cenizas, y $13,09 \pm 3,37$ mg N OTMA/100g, y $0,14$ mg N TMA/100g a tiempo 0. En este caso se realiza una toma de muestras prácticamente día a día para tener un exhaustivo conocimiento del patrón de degradación en cada caso: sardina en condiciones estándar y óptimas (MH), sardina en condiciones habituales y poco adecuadas (MA) y finalmente, sardina a vacío, como una variante simple del MAP, con ausencia de oxígeno (MV). En base a estos resultados, se redefinirá la toma de muestras en siguientes experimentos, aplicando un mayor esfuerzo en el rango de tiempo donde se estime que alcanza su vida útil.

La evolución sensorial global de los distintos lotes se representa en la Imagen 60, como valor Q en fresco, y según el sistema QIM (Imagen 61). El límite de aptitud se establece en 1 punto de la escala de valoración organoléptica.

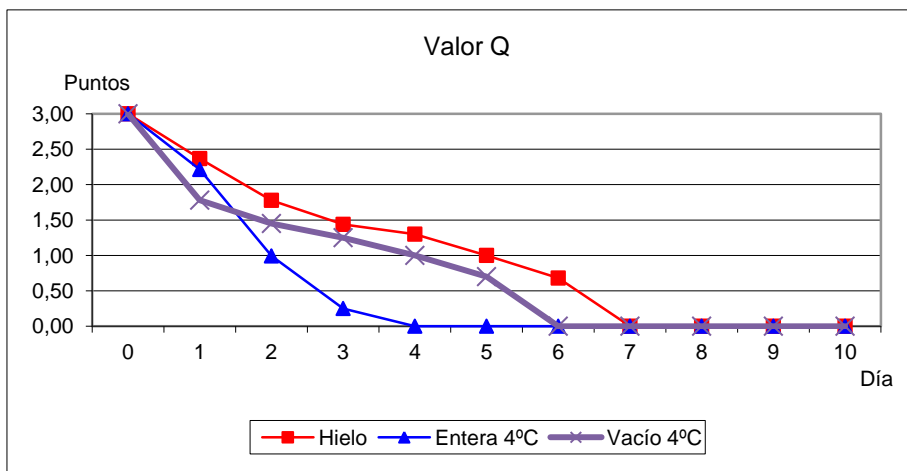


Imagen 60. Evolución del valor medio sensorial (Valor Q) de la sardina refrigerada.

La sardina entera tratada tradicionalmente con hielo en escamas se rechaza a día 5, frente a los 2 días de vida útil cuyo la temperatura de almacenamiento ronda los $+4^{\circ}\text{C}$. El uso de MAP a $+4^{\circ}\text{C}$, en este caso vacío, equipara la vida útil a una situación intermedia, esto es, 4 días, si bien debemos resaltar la ausencia de las vísceras y cabeza, y por tanto la ausencia de bacterias y enzimas procedentes de las vísceras, que condicionan el lote tradicional. Pero éste se halla a temperaturas cercanas a 0°C y el agua de lixiviación del hielo favorece la pérdida de compuestos volátiles y bacterias de la piel, minimizando los olores desagradables.

Con el sistema QIM, a diferencia del anterior sistema de calificación que en el global incorpora el análisis cocido, sólo se consideran los atributos en fresco, por lo que en su aplicación al lote a vacío sólo se contempla la textura, aspecto de la piel, el olor a la apertura y color de la carne.

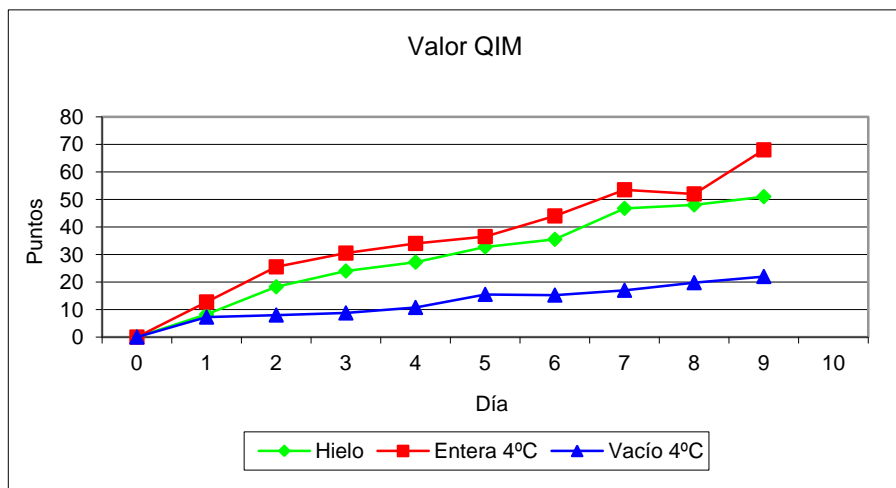


Imagen 61. Evolución del análisis QIM para sardina refrigerada.

El sistema QIM sólo acumula puntos del total de atributos, pero en el fondo, el evaluador debe señalar (criterio personal) el límite de aptitud, lo que condiciona un poco la interpretación de los resultados, a menos que la forma de trabajar de determinada empresa esté optimizada. Así, si consideramos al lote control como el que establece el límite de aptitud, el límite sensorial se hallaría en los 15,5 puntos (5 días en hielo). Según este criterio, y respecto a los lotes MV (vacío 4°C) y MA (aire entera 4°C), ambos no alcanzarían los 2 días de almacenamiento.

Ante el hecho de la eliminación de cabeza y vísceras en las muestras tratadas con MAP (en este caso vacío), es evidente la necesidad de equilibrar los resultados sensoriales, por lo cual sólo se contemplan las cualidades presentes en pescado fresco y para los tres casos que es el aspecto, la textura y olor de la piel, además de considerar los parámetros de análisis en cocido. Los resultados en cocido son tratados por separado de los frescos y mostrados en la Imagen 62 (Valor Q cocido).

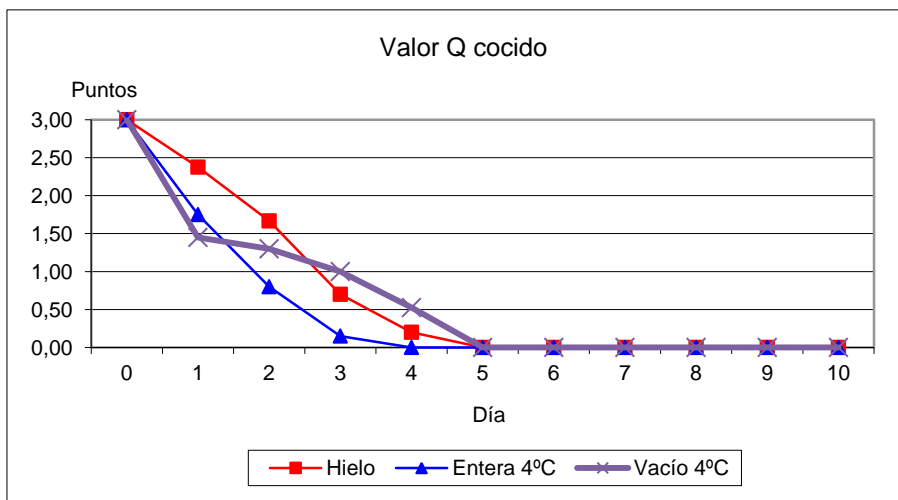


Imagen 62. Valoración media de sardina cocida sometida a almacenamiento refrigerado.

Como se puede observar, la pauta de evolución es muy diferente al Valor Q global, dado precisamente que se le asigna una mayor importancia en la evaluación sensorial a parámetros netamente vinculados a la alimentación, es decir, en condiciones normales de elaboración culinaria como es el sabor, el olor y la textura, principalmente.

En este caso, MH y MV alcanzan en ambos casos los 3 días de almacenamiento, destacando por un sabor a aminas y un sabor agrio-ácido, respectivamente. El lote MA se rechaza a día 2. En todos los casos, sensaciones de rancidez en olor son tenues, pero desplazan otras sensaciones olorosas a un segundo plano durante el análisis sensorial (como las derivadas de la actividad bacteriana). Este hecho se justificaría por la presencia de una tasa grasa incipiente en el músculo (4%), característico de una etapa en donde la sardina comienza a almacenar grasa bajo la piel (primavera). Se elabora una representación gráfica atendiendo sólo a las sensaciones relacionadas con la oxidación lipídica, esto es, la rancidez, que se muestra en la Imagen 63.

Esta sensación odorífera se hace ligeramente manifiesta en el lote entero a +4°C (MA), que se minimiza con el uso del hielo por la

lixiviación parcial de la superficie del pescado almacenado en hielo (MH). Mientras que esta sensación es ausente en el lote MV a +4°C durante todo el ensayo, donde prevalecen y dominan otras sensaciones, extrañas y que derivan a calificaciones desagradables hacia el final del estudio, como tonos ligeramente ácidos, sulfurados. En este caso, y en general, a pesar del contenido de vísceras en las muestras en aerobiosis, la sensación odorífera dominante en el músculo es la correspondiente a la alteración grasa, frente a la alteración bacteriana y generadora de aminas volátiles o clásico olor “a pescado”, que queda colapsada durante los primeros 3 días de almacenamiento. A continuación, los compuestos volátiles derivados de naturaleza amoniacal (a amina), ganan en intensidad.

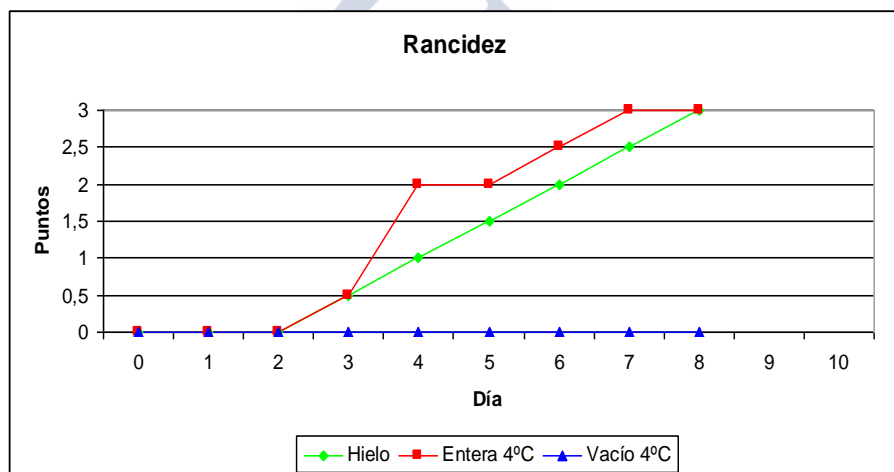


Imagen 63. Evaluación del grado de rancidez de sardina en condiciones de refrigeración.

En la Imagen 64 a Imagen 66 se representa en gráficos de telaraña (Perfil Sensorial) los valores obtenidos para los diferentes atributos evaluados para sardina entera en hielo y en aire a 4°C, a día 1, 5 y 7. El límite de aptitud sensorial en el caso de sardina en hielo se establece en 5 días como se comentó anteriormente, y 2 días para la sardina a +4°C, definido en ambos casos por el olor a pescado de las branquias. En el caso de conservación a +4°C, además acentuado por

la intensidad de la sensación olor mohoso (a humedad) y color pardo de las branquias, olor a rancidez del músculo, olor amoniacal intenso de las vísceras, mientras que en el músculo cocido la presencia de marca de la espina y la pérdida de brillo de la piel, son parámetros que se acentúan con el transcurrir del tiempo.

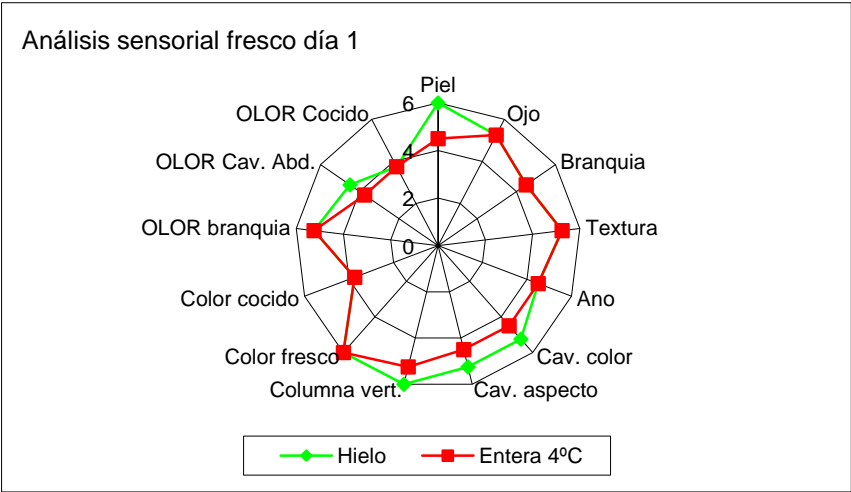


Imagen 64. Perfil sensorial de sardina entera según condiciones de refrigeración (día 1)

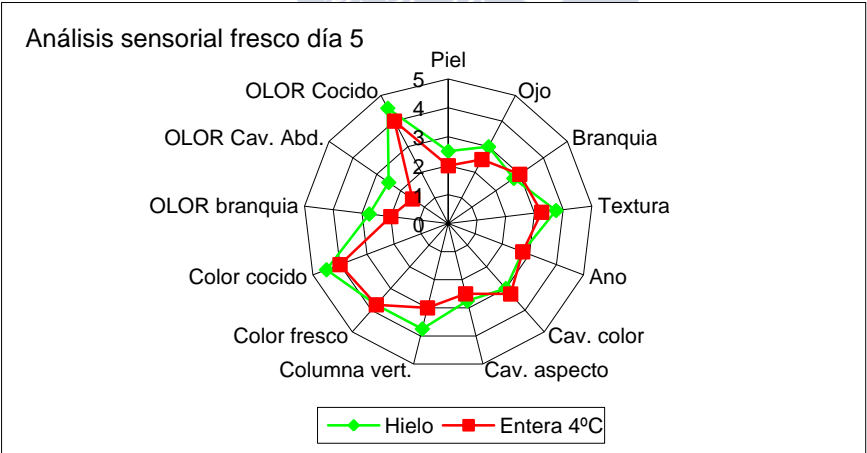


Imagen 65. Perfil sensorial de sardina entera según condiciones de refrigeración (día 5)

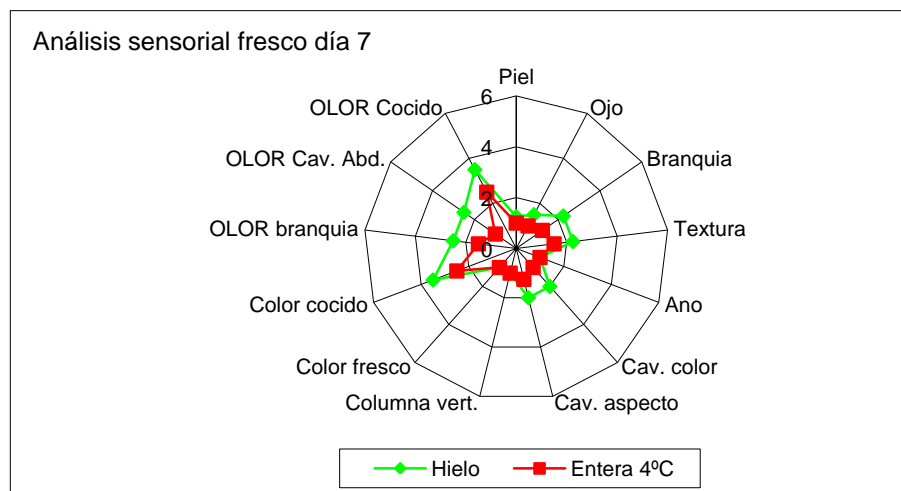


Imagen 66. Perfil sensorial de sardina entera según condiciones de refrigeración (día 7)

Para equiparar a los resultados de las muestras tratadas a vacío MV (+4°C), los ejemplares enteros en hielo (MH) y en aire a +4°C (MA) sólo se comparan los perfiles sensoriales respecto a los parámetros relacionados con el análisis en cocido (Imagen 67 a Imagen 69, correspondientes a día 1, 5 y 8 de almacenamiento).

A día 5, el límite de aptitud para sardina en hielo (MH) según los criterios evaluados en su totalidad, las diferencias con los otros 2 lotes no son significativas a excepción del color del músculo, donde el lote a vacío (MV) presenta un color de tono ligeramente más oscuro a los otros 2 lotes ($p < 0,05$), posiblemente por efecto de la fuerza de vacío (presión negativa) que haya reventado vasos sanguíneos que con el tiempo impregnan el músculo de su contenido y subsecuente actividad enzimática. El olor, ligeramente “a pescado” en las muestras en hielo (MH), y extraño pero no desagradable en los lotes almacenados a +4°C (MV y MA). A medida que avanza el tiempo de almacenamiento, las diferencias entre lotes son más patentes. La muestra a vacío mantiene un color más suave, que se oscurece hacia tonos crema en el caso del lote en hielo (MH) y a +4°C (MA). En este último además, hay que sumar el efecto de la oxidación de su parte

grasa, con reacciones de *Maillard*, y dada la mayor temperatura de conservación, las marcas de la espina son mucho más patentes y oscuras (tonos pardos) que las muestras en hielo.

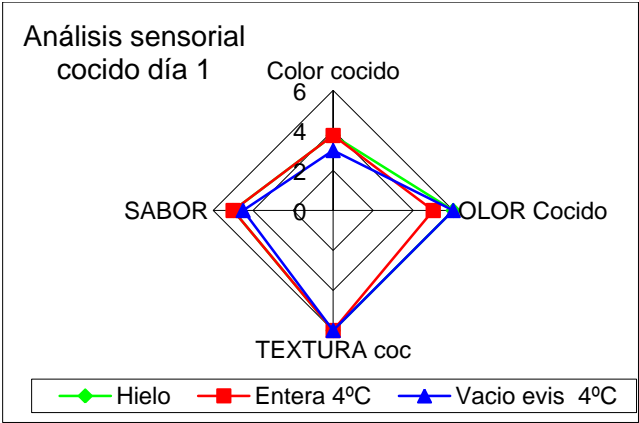


Imagen 67. Perfil sensorial en cocido de sardinas refrigeradas (día 1)

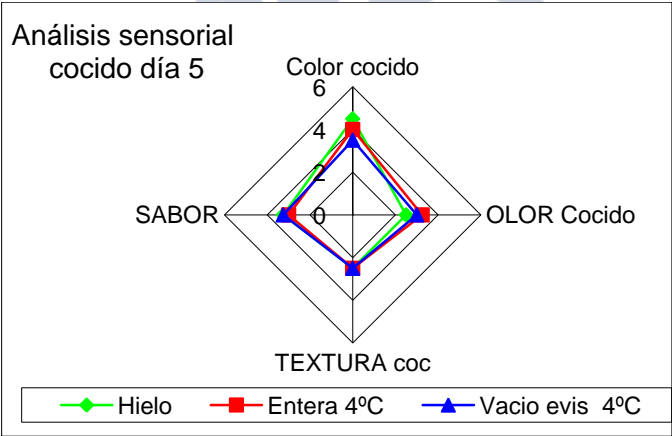


Imagen 68. Perfil sensorial en cocido de sardinas refrigeradas (día 5)

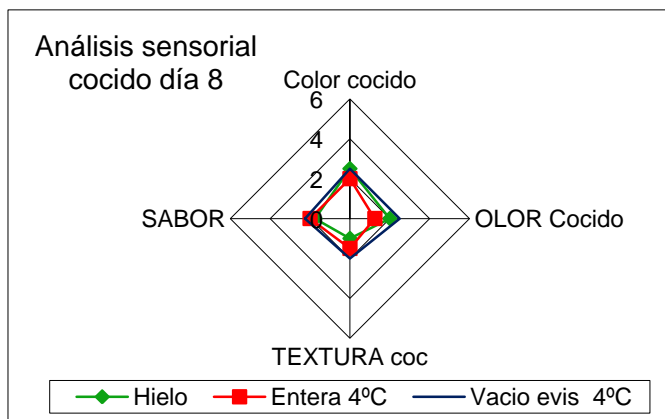


Imagen 69. Perfil sensorial en cocido de sardinas refrigeradas (día 8)

En cuanto al olor, las muestras enteras a +4°C (MA), presentan una intensidad a rancidez y amoniacal que provoca su menor puntuación respecto a los otros 2 lotes ($p < 0,05$), que en el caso del lote a vacío (MV), las sensaciones vinculadas a procesos de alteración son los más livianos. La textura en el caso del lote en hielo (MH) se torna más blanda al principio de la masticación, para luego pasar a sensaciones de harinosidad y sequedad; en la muestras del lote entero a +4°C (MA) esta textura es seca y fibrosa, mientras que el lote a vacío es el que presenta mejores sensaciones y hasta el final del estudio.

Respecto al sabor, a día 8 las muestras a vacío (MV a +4°C) se hallan en el límite de aptitud para este atributo, adquiriendo sensaciones ácidas hacia el final del estudio, mientras que en el caso del lote de sardina entera en hielo (MH) presenta sensaciones astringentes que son las que provocan su rechazo, y que se acentúa en el lote de sardina entera a +4°C en el mismo tiempo.

Aunque en la literatura científica hay varias publicaciones relacionadas con la vida útil de la sardina refrigerada, la gran parte corresponde a países con unos hábitos gastronómicos y culturas diferentes (países árabes del entorno mediterráneo), contraria al criterio que puedan aportar regiones de países europeos con gran tradición pesquera, caso de Galicia. Así, es fácil observar límites de vida útil de entre 7 y 9 días, basados principalmente en criterios

sensoriales externos, donde el baremo de partida está argumentado en las características externas según la tabla organoléptica de establecida por la UE (UE, 2013; Tabla 27), siempre y cuyo los límites microbiológicos y químicos se hallen por debajo de los establecidos por la legislación o recomendaciones, según el caso, por lo que es fácil observar hasta 9 días de vida útil en condiciones de almacenamiento en hielo en cámara a $+2/+4^{\circ}\text{C}$ (El Marrakchi y col., 1990; Ababouch y col., 1991; Erkan y Ozden, 2008).

Interesante señalar, a nuestro criterio, un fallo en esta tabla como es el descriptor *plateado* del opérculo. Los conocedores de esta especie y otras pelágicas, más cuando se recibe dicha especie a bordo o en la descarga en puerto, dicho opérculo posee una característica mancha dorada que suele perdurar unas 24 h (nada que ver con el descriptor “amarillentos” de la categoría No Admitidos de la tabla de la UE), dependiendo de las condiciones de almacenamiento. Este hecho se puede observar en la Imagen 70 e Imagen 71, los cual indica que los expertos que desarrollaron dicha tabla son desconocedores de las auténticas cualidades intrínsecas de frescura máxima en el caso de la *Sardina pilchardus*. O que la descripción fue desarrollada con una demora importante entre la captura/descarga hasta sus análisis. Hoy día, las infraestructuras y logísticas de los sistemas de distribución, permiten que esta sardina llegue a los mercados en condiciones de frescura máxima.

En cualquier caso, estos límites establecidos anteriormente son elevados según los datos obtenidos por nuestro panel de cata, muy similares a los señalados por Nunes y col. (1992) para esta especie, o por Pacheco-Aguilar y col. (2000) para *Sardinella sagax*. Con sardina entera y eviscerada, Erkan y Ozden (2008) no aprecian diferencias sensoriales significativas a los 7 días de refrigeración con hielo, ni siquiera en el análisis sensorial cocido, al contrario que lo expuesto por Rodríguez y col. (1991) que parten de ejemplares con tasa media de grasa (12%), donde el rechazo de la sardina es principalmente por sensaciones a rancio (4 días).

Tabla 27. Baremo sensorial para características de especies pelágicas (UE y RD 331/99).

Especie	Criterios			
AZUL	Categoría de frescura			
	Extra	A	B	No admitidos
Piel	Pigmentación tomasolada, colores vivos y brillantes con irisaciones; clara diferencia entre superficie dorsal y ventral	Pérdida de resplandor y de brillo; colores más apagados; menor diferencia entre superficie dorsal y ventral	Apagada, sin brillo, colores diluidos; piel doblada cuando se curva el pez	Pigmentación muy apagada; la piel se desprende de la carne
Mucosidad cutánea	Acuosa, transparente	Ligeramente turbia	Lechosa	Gris amarillenta, opaca
Consistencia de la carne	Muy firme, rígida	Bastante rígida, firme	Un poco blanda	Blanda (flácida)
Opérculos	Plateados	Plateados, ligeramente teñidos de rojo o marrón	Parduzcos y con extravasaciones sanguíneas amplias	Amarillentos
Ojo	Convexo, abombado; pupila azul negra brillante; párpado transparente	Convexo y ligeramente hundido; pupila oscura; córnea ligeramente opalescente	Plano; pupila borrosa; extravasaciones sanguíneas alrededor del ojo	Concavo en el centro; pupila gris; córnea lechosa
Branquias	Color rojo vivo a púrpura uniforme; sin mucosidad	Color menos vivo, más pálido en los bordes; mucosidad transparente	Engrosándose y decolorándose; mucosidad opaca	Amarillentas; mucosidad lechosa
Olor de las branquias	Frescos, a algas marinas; picante; a yodo	Ausencia de olor a algas; olor neutro	Olor graso un poco sulfuroso, a tocino rancio o fruta descompuesta	Agrio descompuesto

Esta sensación es mucho más evidente en la sardina eviscerada (3 días), mientras que los primeros autores no indican ni la fecha de captura ni la tasa de grasa, un criterio importante a considerar. Papadopoulos y col. (2003) ofrecen en el caso de lubina (*Dicentrarchus labrax*) de cultivo eviscerada hasta 13 días de vida útil frente a los 8 días de ejemplares enteros en hielo, principalmente basados en el criterio sensorial global. Sin embargo, Erkan y Ozden (2006) no encuentran tales diferencias para esta misma especie. Pero como en otros muchos casos, es difícil el relacionar o comparar resultados de especies tan diferentes como especies magras/grasas, o salvajes/acuicultura, un criterio muy habitual, pues partiendo de supuestos de manipulación y postcaptura idénticos, hay que tener en cuenta la especie, época de captura, tipo de alimentación, zona de pesca, tratamiento a bordo, etc. como ya indicaron hace décadas Kietzman y col. (1969), y a nuestro criterio, es importante la cultura

gastronómica o alimentaria regional, ya que el consumidor habitual de este producto pesquero tiene su estándar mental predefinido.



Imagen 70 . Mancha dorada en opérculo de sardina (flecha), como indicador máximo de frescura.



Imagen 71. Detalle del opérculo.

El valor de pH (Imagen 72) muestra relación con las sensaciones apreciadas en el análisis organoléptico. Se observa una tendencia en los tres lotes a bajar hasta alcanzar en torno a 6,0 durante los primeros 4 días, ligeramente más acusado en el lote a vacío, que lentamente aumentan hacia el final del estudio, sobrepasando el valor de pH 6.5 al cabo de una semana para los lotes almacenados en aire, mientras que el lote a vacío (MV) se mantiene significativamente por debajo de este valor ($p<0,05$), donde las sensaciones observadas durante la cata son ácidas.

En la Imagen 73, se muestra la evolución de BVT, como principal parámetro químico de alteración autolítica y bacteriana sobre los precursores nitrogenados (aminoácidos, OTMA, ...). Durante los primeros 5 días no se aprecian diferencias significativas entre los distintos lotes, pero a partir de ese momento, el lote MH se mantiene en torno a los 14-18 mg N/100g de forma independiente al resto de lotes ($p<0,05$). Pero desde el día 5 despuntan a la par los lotes MV y MA ($p>0,05$) durante 6 días, momento en que el lote MA aumenta significativamente respecto a los demás lotes.

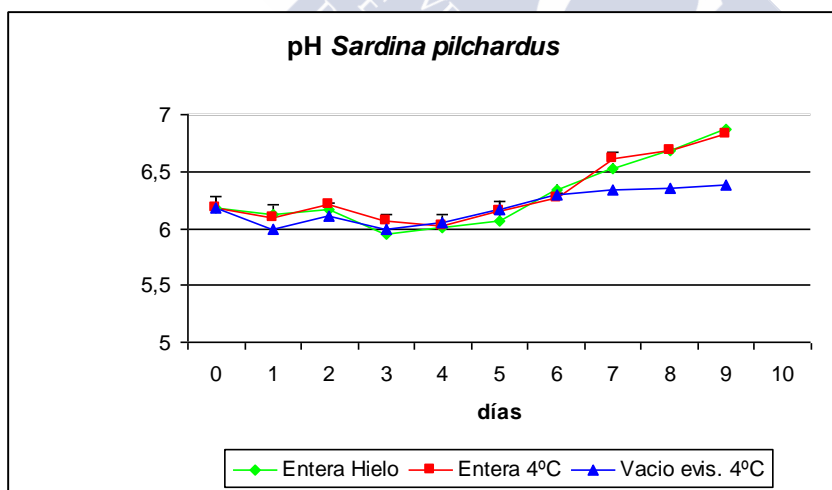


Imagen 72. Evolución de pH durante el almacenamiento refrigerado de sardina.

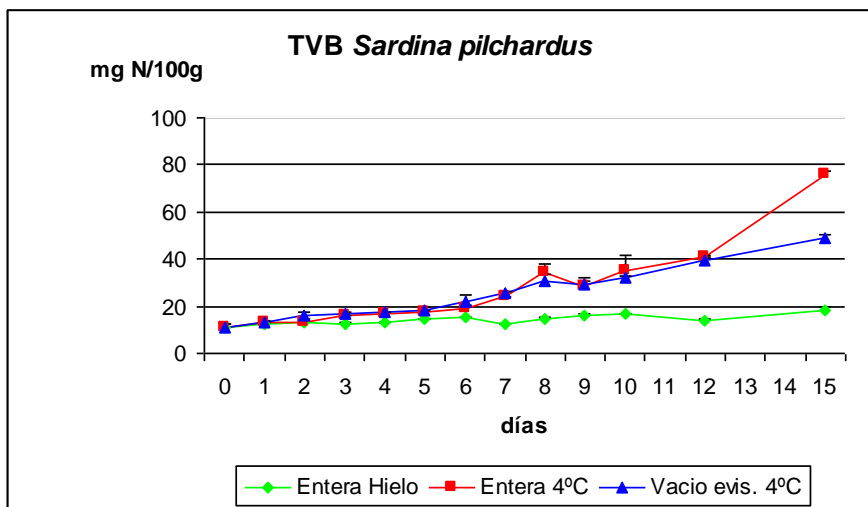


Imagen 73. Evolución de BVT (o TVB) de sardinas refrigeradas.

A nivel bioquímico, con el deterioro el pH aumenta, principalmente por la actividad bacteriana, pero este criterio no es un buen parámetro a considerar para evaluar la frescura del pescado sin el aporte de otra analítica como la microbiológica o bioquímica (Ludorff y Meyer, 1973; Nunes y col., 1992). Este aumento de pH está relacionado con la producción de aminas, principalmente NH_3 y/o NH_4 (principal componente del BVT), por lo que algunos autores proponen para especies grasas, como la sardina, valores límite de 20 mg N/100g (Sikorski y col., 1994) y de TMA en torno a 5-10 mg N/100g, que en el caso de sardina raramente alcanza el valor de 5, cuya integridad ya está alterada (El Marrakchi y col., 1990; Ababouch y col., 1996).

Los parámetros químicos suelen ser más elevados en ejemplares enteros, debido a la actividad en el tiempo de la flora bacteriana inherente a la cavidad visceral que invade el músculo (Erkan y Ozden, 2008), quienes además obtienen valores de histamina en torno a 50 ppm al límite de aptitud sensorial (7 días), pero señalar que la materia prima de partida ya posee 12 ppm, lo cual refleja una mala manipulación postcaptura y/o tiempo excesivo desde la captura hasta

posteriores análisis (que en nuestro caso fue de 11 horas). En otros casos, en países del norte de Africa, los valores de Histamina superan las 100 ppm que establecen las Autoridades Sanitarias Europeas en el límite de aptitud (El Marrakchi y col., 1990; Ababouch y col., 1991), lo que refleja un claro abandono de las buenas prácticas de manipulación a bordo y/o en tierra, en zonas donde las temperaturas ambiente son elevadas.

Respecto al índice de TBA (Imagen 74), el lote a vacío (MV) no muestra una formación significativa durante el experimento, mientras que en los lotes en aire a diferentes condiciones de almacenamiento, es significativamente mayor a +4°C a partir del 4º día en relación al lote almacenado con hielo, con una alta correlación con el atributo de rancidez en el análisis sensorial en la primera semana ($R^2 = 0,9677$), al igual que lo observado durante la evaluación de varias especies en hielo (Simeonidou y col., 1997; Rodríguez y col., 1999; Aubourg y col., 2002; Losada y col., 2007). En el límite de aptitud alcanzan 2,1 y 4,2 mg/kg para lotes MA y MH, respectivamente. El lote MV, la tasa de MDA es baja permaneciendo constante, coincidiendo un pequeño máximo de 0,4 mg/kg con su límite de aptitud. En el 8º día, cuyo todos los lotes están muy alterados, presentan valores de 9,6, 5,8 y 0,3 mg/kg para las muestras evisceradas, enteras en hielo y a vacío, respectivamente.

Sin embargo, a pesar de esta correlación, algunos autores no consideran este parámetro químico como un parámetro fiable a la hora de limitar la vida útil del pescado en MAP o de establecer una correlación adecuada con el análisis sensorial (Alfaro y col., 2013), ya que la formación de complejos moleculares del MDA con proteínas, nucleótidos, aminos (bases de Schiff), etc. no representa la cantidad total de MDA que se pueda generar en el músculo para así optimizar un valor de referencia o de estimación para su vida útil en base a la rancidez, pero este fenómeno tiene lugar en fases avanzadas de alteración (Karlsdottir y col., 2014).

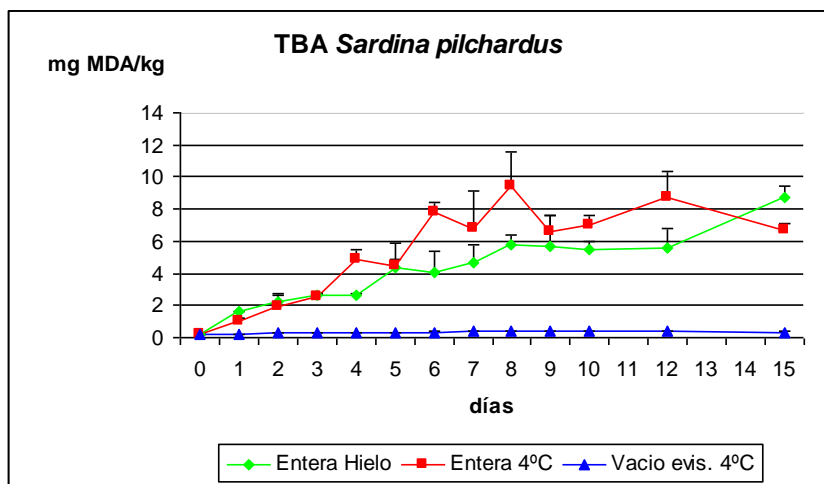


Imagen 74. Evolución del índice de TBA durante el almacenamiento refrigerado de sardina.

Nuestro principal criterio químico en correlación con el análisis sensorial es el índice de TBA, que evalúa productos secundarios de la oxidación lipídica, principalmente malondialdehído (MDA), un parámetro muy empleado en la evaluación de la alteración de la fracción grasa de alimentos en general (Kolokowska y Deutry, 1983; Rodríguez y col., 1990; Rodríguez y col., 2005; Karlsdottir y col., 2014). En nuestra opinión, el TBA es el principal parámetro químico a la hora de valorar la frescura, que en nuestro caso ronda los 2,3 mg MDA/kg. El proceso de eviscerado, si bien elimina la mayor parte anatómica de la sardina responsable del deterioro bacteriano, contribuye a aumentar el deterioro grasa y por tanto a incrementar la sensación de rancidez.

Estos datos concuerdan con lo indicado por Ehira y Uchiyama (1987), Dalgaard y col (1993) y Love (2001). Tras la muerte de los animales, por vía anaerobia se forma ácido láctico a partir del poco glucógeno existente, baja el pH. El incremento que se observa hacia el final del almacenamiento refrigerado, se atribuye a la formación de compuestos básicos (Huss, 1994). Así mismo, factores tales como la inanición, sobrealimentación, reserva de glucógeno, etc., influyen en el valor *postmortem* del pH (Rodríguez y col., 1991). Sin embargo, el

fenómeno de bajada de pH más prolongado en el tiempo en pescado a vacío (MV) frente al envasado en aire ya fue descrito para trucha grasa por Rodríguez y col. (1999), si bien, su origen es desconocido, mientras que en pescado envasado en MAP, la bajada de pH se asocia a la formación de ácido carbónico a partir del CO₂ absorbido por el músculo (Parkin y col., 1981; Giménez y col., 2002).

4.3.2. Refrigeración II. Sardina envasada en atmósferas protectoras (MAP) en refrigeración, entre +1° y +4°C.

Experimento A. Este ensayo realizado con Sardina de Agosto 1992. Los ejemplares (n=15) poseen una talla de 136,3±9,5 mm, y un peso de 33,98±8,53 g. La composición básica fue la siguiente: humedad 66,6%, proteínas 19,9%, lípidos 10,77% y cenizas 1,55%. Estos ejemplares poseen una talla comercial mediana, inmaduros y con una proporción de grasa elevada, la esperada para la época y talla obtenida.

Para este ensayo se realizan 2 lotes de MAP, donde AA corresponde a sardina entera, AE sardina eviscerada-descabezada (tronquito), A50 tronquito envasado con EAP50 (50:50, CO₂:N₂) y A60 tronquito envasado con EAP60 (40:60, CO₂:N₂), almacenados en cámara fría a +4°C. En la Tabla 28 se exponen los valores medios de un panel de cata de 4 jueces.

Tabla 28. Análisis sensorial (valor Q) de sardina Agosto envasada en MAP a +4°C.

DIA	Lote			
	AA	AE	A50	A60
0	3,00±0,00	2,98±0,01	2,90±0,03	2,95±0,02
1	2,42±0,27	2,62±0,15	2,21±0,25	2,70±0,11
2	1,97±0,35	1,28±0,16	2,46±0,09	2,31±0,04
4	0,95±0,12	1,08±0,21	1,98±0,23	1,62±0,31
6	0,61±0,22	0,74±0,11	1,36±0,34	1,64±0,19
8	0,01±0,14	0,15±0,04	0,78±0,11	1,08±0,32
11	0	0	0,17±0,06	0,15±0,13

Desde el punto de vista sensorial, el lote control, no eviscerado (AA), fue rechazado al 4º día por sensaciones iniciales relacionadas con descriptores amoniacales; el eviscerado (AE) un día más tarde pero por sensaciones gustativas astringentes y olor a rancidez. De los lotes en MAP, el lote A50 mantiene su aptitud hasta el día 6, y aunque el lote A60 se rechaza a día 8 (a pesar de tener un valor por encima del límite de 1 punto), la variabilidad mostrada por el panel de cata sugiere su rechazo. Es decir, la mayor duración o vida útil de la sardina almacenada en estas condiciones se logra con envasado MAP, preferentemente con el lote con menor tasa de CO₂ en su composición gaseosa (lote A60).

Los lotes almacenados en MAP se rechazaron ambos al día 6 por sensaciones ácidas o agrias, a SH₂, pero en ningún momento se detectó sensación a rancidez, al igual que lo observado por Alfaro y col. (2013), quienes sí observaron formación de otros aldehídos como acetaldehído y butiraldehído, pero cuando el pescado (jurel) se almacena en condiciones abusivas (+10°C). Sin embargo, en trabajos de países de cultura musulmana, es habitual ofrecer valores de 9 días de vida útil para sardina entera refrigerada (El Marrakchi y col., 1990), y de 5 o 7 días según se aplique el criterio de la QIM o UE, respectivamente (Erkan y Ozeden, 2008). El uso de atmósferas protectoras, incluyendo el vacío, el periodo de anaquel aumenta considerablemente hasta 13 días para esta especie (Kenar y col., 2010), y hasta 12 días si se incorpora en el envase hasta un 5% de clinoptilolita (mineral natural, del grupo de las ceolitas) para que absorba compuestos volátiles, especialmente los vinculados a malos olores o típicos “*a pescado*” (Kuley y col., 2012). Pero en ningún momento asociado a las cualidades que pueda presentar el pescado elaborado para su consumo (cocido).

A continuación, exponemos los resultados obtenidos de los análisis de pH (Imagen 75). En el gráfico se observa como el valor de pH inicial es ligeramente ácido, acorde a lo observado en otros trabajos, incrementándose paulatinamente en todos los casos, pero de forma más rápida a partir del 4º día, en el caso del lote de ejemplares enteros (AA), gracias a la actividad bacteriana, especialmente aportada por las vísceras. En el resto de lotes, la evolución del pH es

más lenta, sobrepasando el pH 6,0 de 2-3 días después de la sardina entera (AA), y sin mostrar diferencias significativas entre éstos.

Tal y como se comentó en el análisis sensorial, existe un grado de rancidez mayor en el lote AE (eviscerado), seguido de cerca por el lote entero (AA), aunque sólo muestran diferencias significativas a día 4 entre estos 2 lotes ($p < 0,05$). A partir de entonces, los mecanismos de oxidación en el lote AA y AE son evidentes, que se incrementan hasta el periodo de estudio. Sin embargo, los lotes en MAP muestran una escasa formación de sustancias reactivas con el TBA, manteniéndose constantes ($p > 0,05$) hasta final del estudio, prácticamente por debajo de 5 mg MDA/kg (Imagen 76).

La generación de aminas se expone a continuación. Las aminas volátiles (BVT y TMA) se representan en la Imagen 77 y Imagen 78, respectivamente. Como se puede observar, el perfil de evolución según cada lote es similar en ambos casos. Sólo el lote AA despunta significativamente a partir del día 2 y 4 en la formación de BVT y TMA, respectivamente. El lote AE va parejo con los lotes en MAP, sin mostrar diferencias significativas, sólo hasta el final, cuyo el deterioro es muy evidente. Así, en la aptitud de los lotes AA y AE (día 3 y 4, respectivamente), la tasa de BVT se halla cerca de los 20 mg N BVT/100 g, y la de TMA en los 1,5 mg N TMA/100 g. En el caso de los lotes MAP, en el límite de aptitud (día 6), su valor de BVT es también similar a los anteriores, no obstante, el valor de TMA es mayor, entre 2 y 3 mg N TMA/100 g.

La evolución del BVT en el lote no eviscerado se incrementa a partir del 2º día con 16,42 mg N/100 g. Los lotes eviscerados (AE y MAP) presentan una evolución similar salvo al cabo de una semana, cuando las muestras en MAP siguen su incremento suave hasta alcanzar 22,76 mg N/100 g, mientras que las envasadas en aire alcanzan los 25 mg N/100 g a los 8 días.

Con el TMA ocurre algo similar a BVT. Durante los primeros 4 días el incremento es similar, sin diferencias significativas, desmarcándose las muestras no evisceradas al 4º día, ya descompuestas, con lisis visceral y peritoneal patentes (1,88 mg N/100 g) alcanzando al final de su estudio 6,04 mg N/100 g. La evolución en las muestras evisceradas (AE y MAP) es similar entre ellas,

alcanzando al final de su vida útil 1,69 y 2,61 mg N/100 g para los lotes AE y MAP (A50 y A60), respectivamente. La correlación de los análisis sensoriales con el TMA ha sido alto ($R^2= 0,9923$), por lo que en este caso, niveles de 2 mg N TMA/100g indicarían el fin de su vida útil, en cualquiera de las circunstancias de envasado.

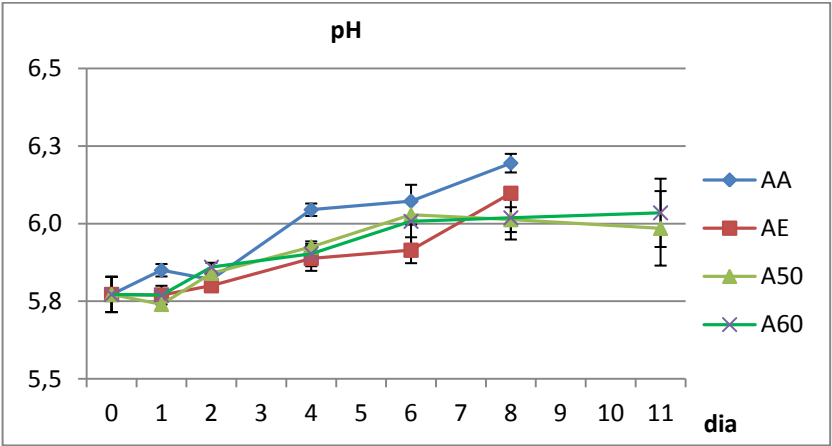


Imagen 75. Evolución de pH en sardina envasada en MAP (+4°C).

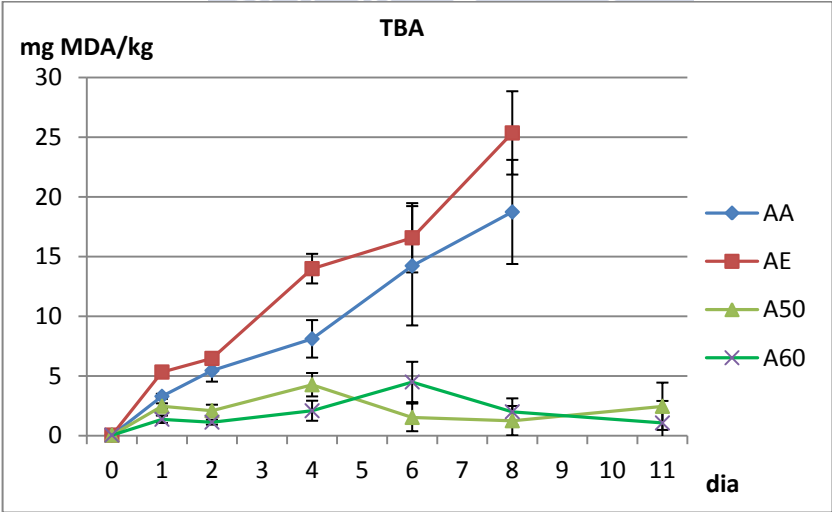


Imagen 76. Evolución de índice de TBA en sardina envasada en MAP (+4°C).

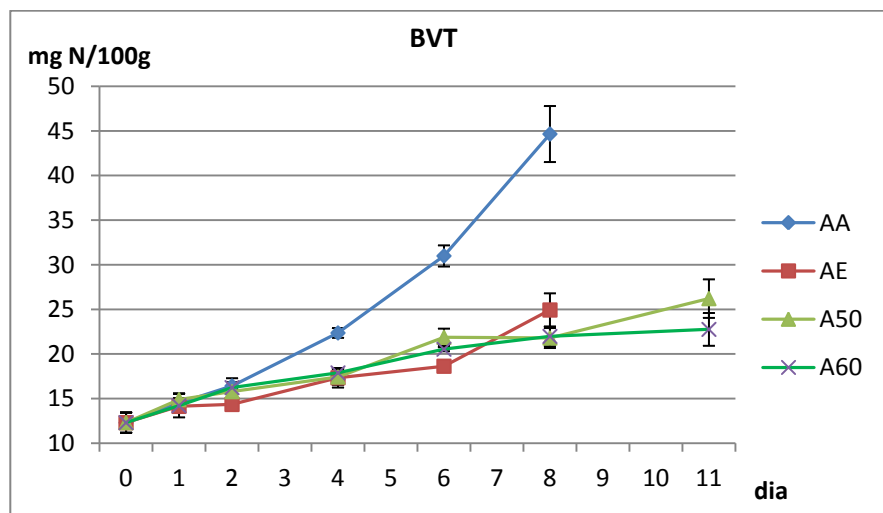


Imagen 77. Formación de BVT en sardina envasada en MAP (+4°C).

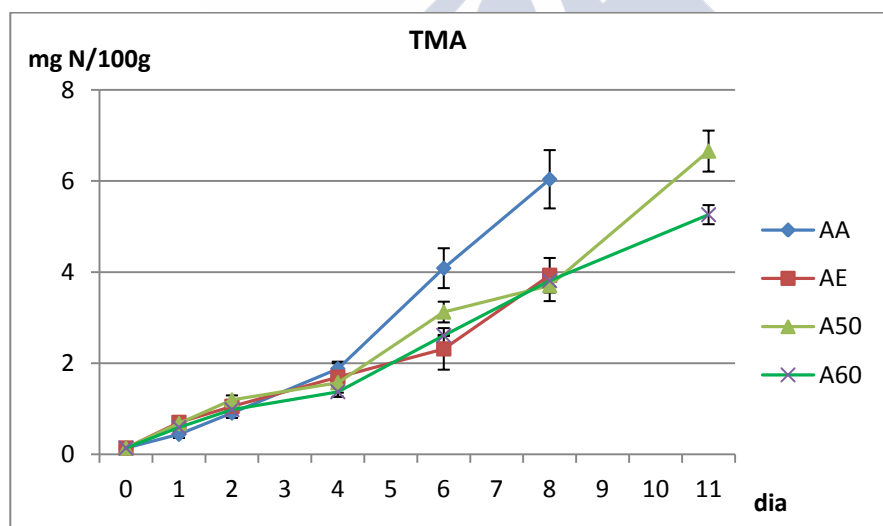


Imagen 78. Formación de TMA en sardina envasada en MAP (+4°C).

Hasta este momento, sólo la baja tasa de TBA de los MAP justifica la mayor vida útil de las muestras frente a los lotes AA y AE.

Para BVT y TMA, los lotes MAP no muestran diferencias significativas con el lote AE en similares condiciones de almacenamiento (+4°C).

En cuanto a la formación de aminos biógenas, en la Imagen 79 y Imagen 80 se muestra un cromatograma de sardina a día 0 y al cabo de 6 días, respectivamente. La formación de cada amina se representa comparada para los diferentes lotes en la Imagen 81 a Imagen 88, según el orden de salida del cromatograma: putrescina (PUT), tiramina (TYR), cadaverina (CAD), histamina (HIS), agmatina (AGM), β -feniletilamina (PHE), espermidina (SPN) y espermina (SPA), respectivamente, durante su almacenamiento refrigerado a +4°C.

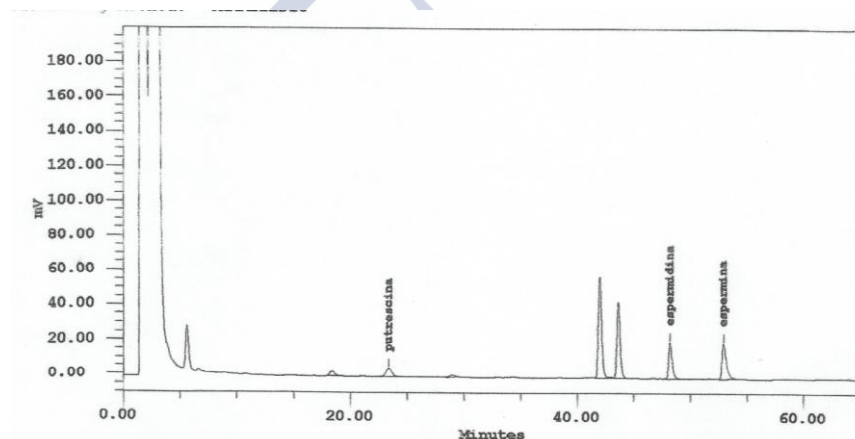


Imagen 79. Cromatograma correspondiente a aminos biógenas de sardina a día 0.

Como se puede observar en estos gráficos, todas las aminos aumentan, a excepción de la SPN y SPA, cuya tasa asciende ligeramente los 2 primeros días para SPN en los lotes no envasados en MAP, y prácticamente se mantiene constante y sin apreciar diferencias significativas entre los diferentes lotes.

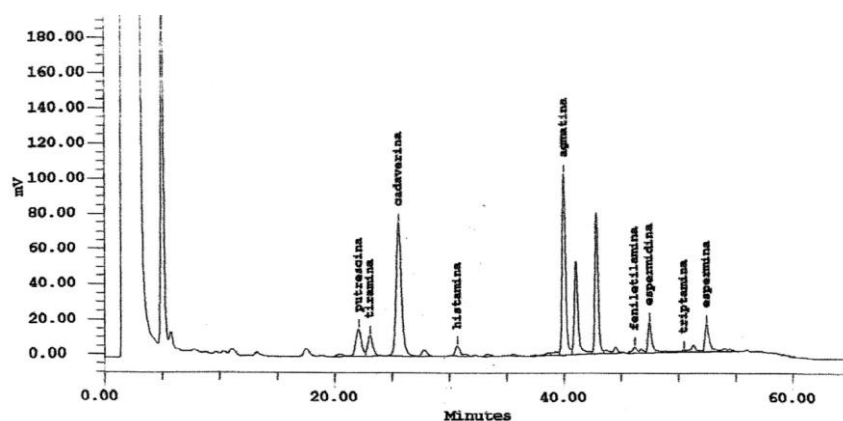


Imagen 80. Cromatograma correspondiente a aminas biógenas de sardina a día 6 (4°C).

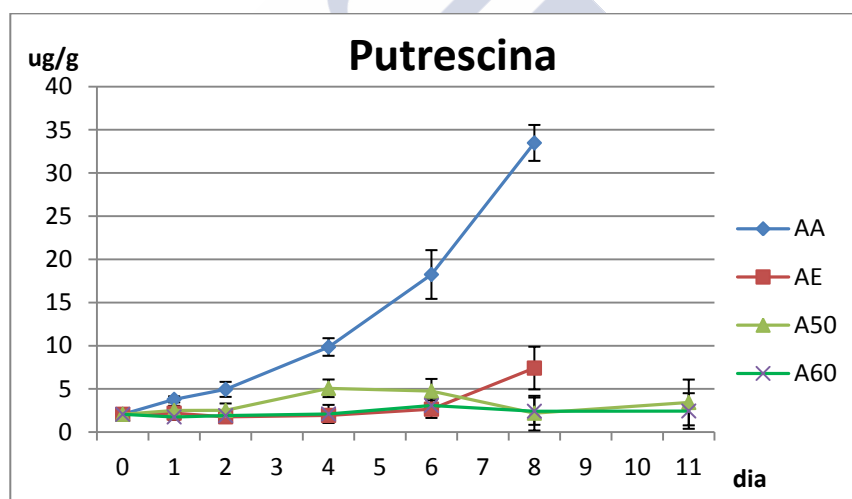


Imagen 81. Formación de PUT en sardina envasada en MAP (+4°C)

En cuanto a la formación de aminas biógenas, destaca la presencia a día 0 (en *rigor mortis*), PUT (2,06 mm), SPN (10,61 ppm) y SPA (14,94 ppm), y pequeñas cantidades de cadaverina (trazas, <0,3 ppm).

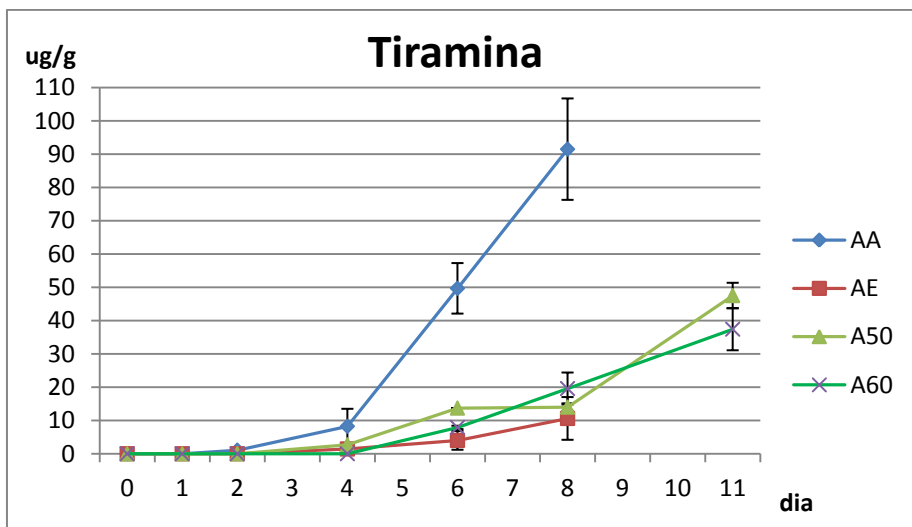


Imagen 82. Formación de TYR en sardina envasada en MAP (+4°C)

Por tratamientos, es el lote de conservación tradicional (AA) en el que despunta sobre el resto de lotes en la formación de aminas en todos los casos. Esta generación es evidente en su explicación, por la flora bacteriana inherente a las vísceras. Así, en torno a su periodo de vida útil, la sardina AA presenta en torno a 7 µg/g para PUT, 5 µg/g TYR, 14 µg/g CAD, 0,4 µg/g HIS, 17,1 µg/g AGM, y 0,07 µg/g PHE. Se puede observar que en estas condiciones de baja temperatura de refrigeración ($\leq +4^{\circ}\text{C}$), las aminas predominantes son la CAD y AGM, despuntando hacia el final la HIS, con niveles similares a la AGM.

En el caso de las muestras evisceradas, la tasa de formación de estas aminas es pareja en el tiempo, pero destacan en aerobiosis (lote AE) como predominantes la HIS hacia el final del estudio, y AGM en el caso de las muestras almacenada en MAP, con valores entre 17 y 29 µg/g en el límite de su vida útil, destacando la CAD con un valor en torno a 44 µg/g en este límite.

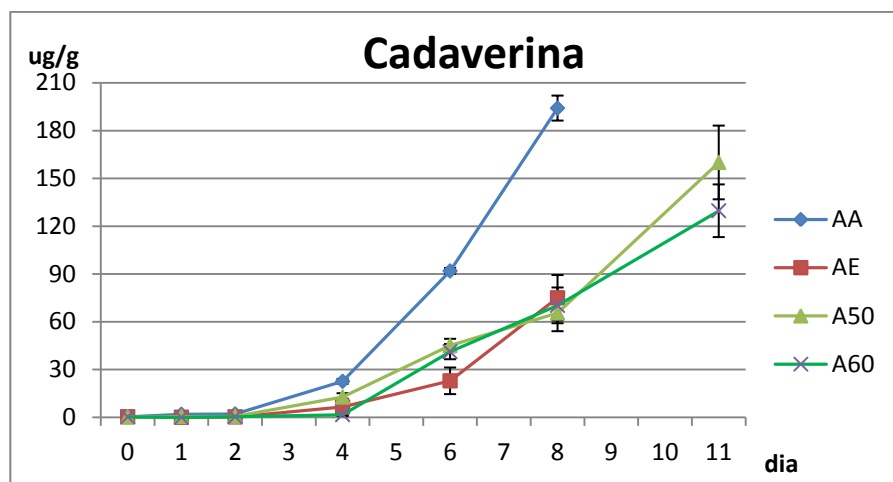


Imagen 83. Formación de CAD en sardina envasada en MAP (+4°C)

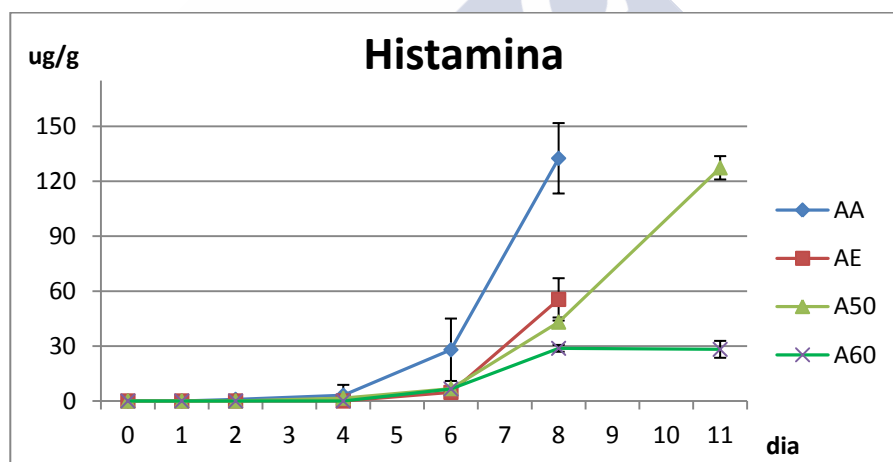


Imagen 84. Formación de HIS en sardina envasada en MAP (+4°C)

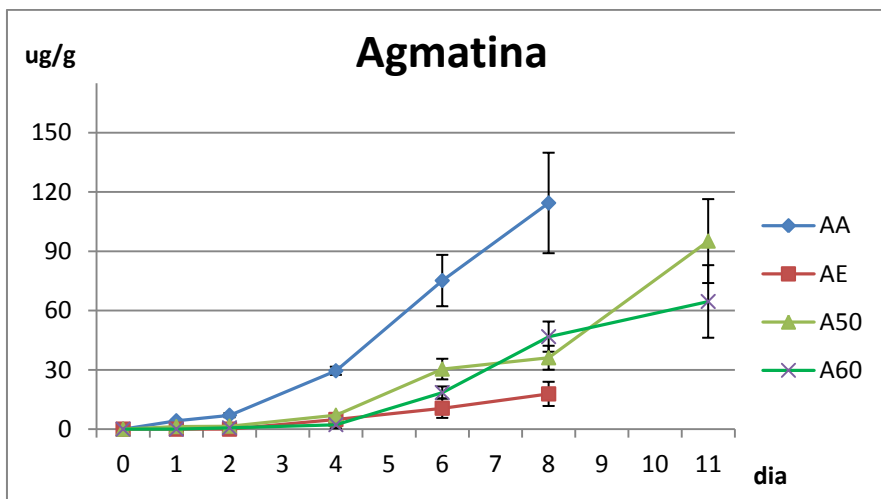


Imagen 85. Formación de AGM en sardina envasada en MAP (+4°C)

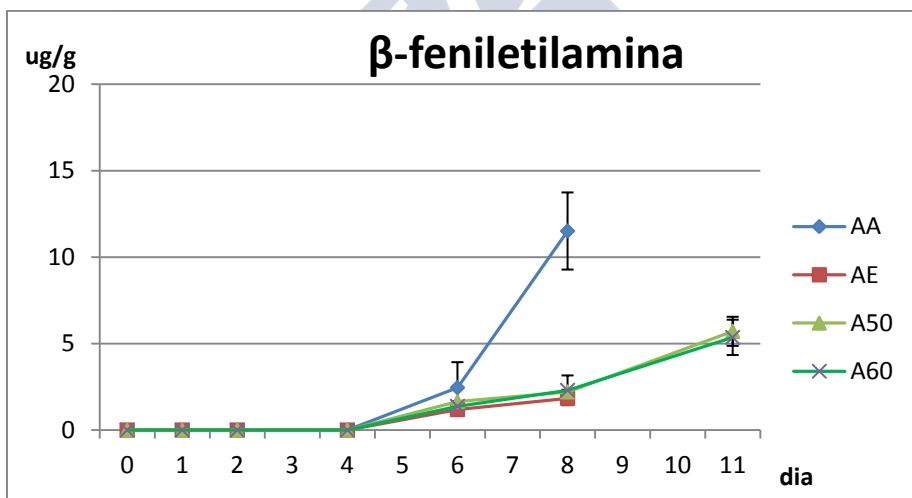


Imagen 86. Formación de PHE en sardina envasada en MAP (+4°C)

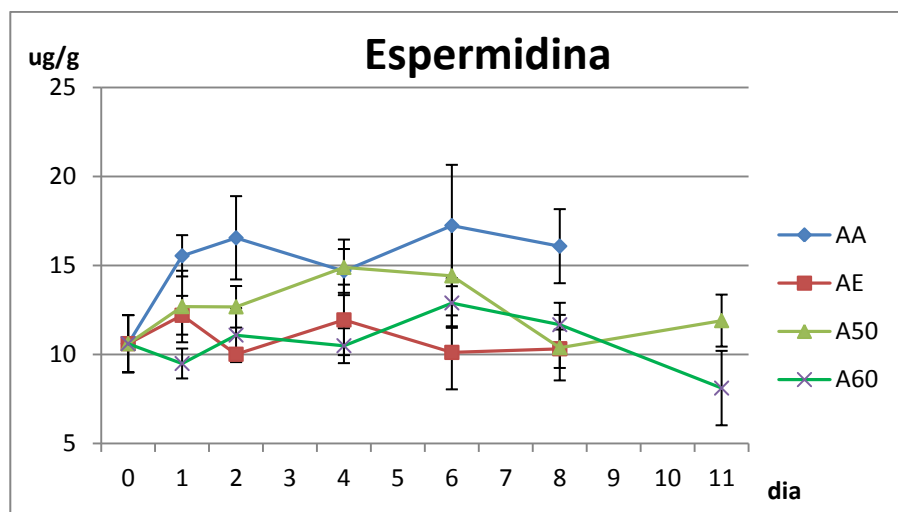


Imagen 87. Formación de SPN en sardina envasada en MAP (+4°C)

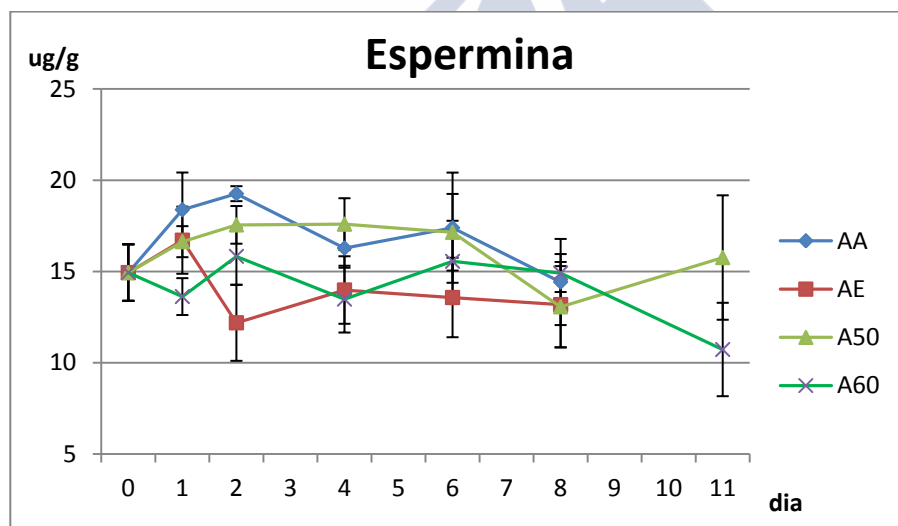


Imagen 88. Formación de SPA en sardina envasada en MAP (+4°C)

La espermidina y espermina presentan una ligera variabilidad entre los lotes pero se mantienen constantes hasta el final del estudio, sin diferencias significativas, con valores comprendidos entre 10 y 15 $\mu\text{g/g}$ para la espermidina y entre 12 y 20 $\mu\text{g/g}$ para la espermina, con la excepción del lote AA, que a día 1, se observa un ligero ascenso ($p < 0,05$) para ambas aminas, para luego disminuir hacia final del ensayo. En cualquier caso, la cantidad presente en las muestras no evisceradas supera ligeramente a las evisceradas. La PUT en el lote no eviscerado, al igual que la CAD e HIS, posee mayor tasa que las muestras evisceradas como es obvio por la flota bacteriana presente en la cavidad visceral, alcanzando 4,95, 2,06 y 0,9 $\mu\text{g/g}$ respectivamente en su límite de aptitud. Las muestras evisceradas en aerobiosis alcanzan al término de su vida útil 1,93, 6,48 y 0 $\mu\text{g/g}$, respectivamente, y la envasadas en MAP 3,08, 41,22 y 6,61 ppm respectivamente.

Se observa que en los lotes eviscerados, la producción de PUT es baja, manteniéndose constante en MAP, mientras que a partir del 6º día asciende en aerobiosis. La CAD sigue la misma tendencia al menos hasta el 8º día para ambas. Con la HIS, sin embargo, ambas siguen un mismo patrón hasta el día 6, cuando las sardinas envasadas en aire (AE) incrementan rápidamente su tasa y en las MAP la Histamina asciende más despacio.

En la tabla siguiente (Tabla 29), se exponen los valores medios de los 5'-nucleótidos y purinas derivadas del ATP. Destacamos la ausencia de ATP y ADP a día 0, con trazas de AMP, primando por tanto la presencia de IMP, HxR e Hx. En la Imagen 89 e Imagen 90 se muestran los cromatogramas correspondientes al perfil de catabolitos del ATP de sardina a día 0 y día 6, respectivamente.

Atendiendo al sumatorio de éstos (ΣATP), se observa que no se aprecian pérdidas importantes en el músculo a lo largo del periodo de estudio, con un valor medio de en torno a 6 $\mu\text{g/g}$ de ATP en origen. Esta constancia refleja su posible validez como un parámetro de frescura útil, no así como en otros casos, donde el agua de fusión del hielo favorece la pérdida de algunas sustancias más solubles, caso del TMA y BVT.

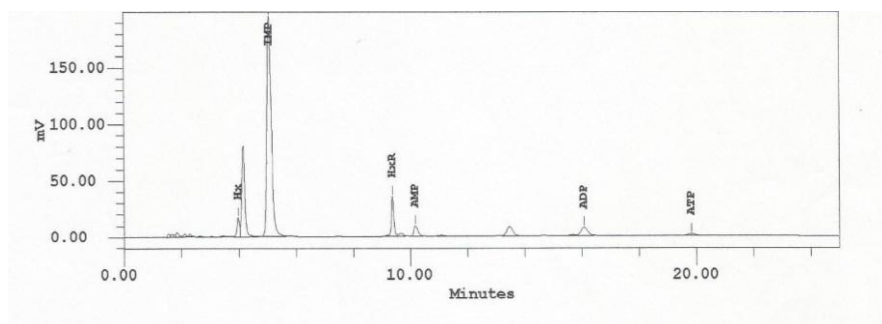


Imagen 89. Cromatograma correspondiente al perfil de derivados del ATP en sardina a día 0 (4°C).

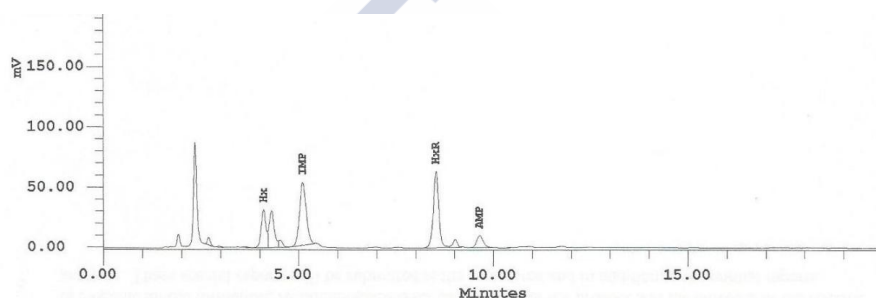


Imagen 90. Cromatograma correspondiente al perfil de derivados del ATP en sardina a día 6 (4°C).

Para cada catabolito del ATP y por lote, a lo largo del periodo de almacenamiento se observa una pérdida acusada y gradual del IMP hasta el final del estudio para cada lote estudiado ($p < 0,05$). En el caso de la HxR, que se genera a raíz del IMP, se observa también su ascenso significativo, en los lotes A50 y A60 se estabiliza durante los últimos días, probablemente debido a que en este momento, la invasión microbiológica del músculo es de tal magnitud que comienza la formación de Hx vía bacteriana. En cualquier caso, a mismo día de almacenamiento en estadios de clara alteración (día 8), la formación de Hx es mayor en los lotes AA y AE ($p < 0,05$), es decir, los que se mantienen en aerobiosis. En todo caso, estos datos confirman que la sardina *Sardina pilchardus*, en condiciones de refrigeración (+4°C), es una especie formadora de IMP (Huss, 1994).

Tabla 29. Contenido en 5'-nucleótidos y purinas de degradación del ATP, en muestras de sardina almacenadas a +4°C.

Lote	Día	IMP	HxR	Hx	ΣATP's
AA	0	5,68 ^a	0,57 ^a	0,24 ^a	6,49 ^a
	1	5,15 ^a	1,20 ^b	0,36 ^{ab}	6,71 ^a
	2	4,54 ^{ab}	1,70 ^{bc}	0,44 ^b	6,68 ^a
	4	3,56 ^b	2,03 ^c	0,80 ^c	6,38 ^a
	6	2,69 ^c	2,21 ^c	1,49 ^d	6,39 ^a
	8	1,66 ^d	2,64 ^d	2,23 ^e	6,53 ^a
AE	0	5,68 ^a	0,57 ^a	0,24 ^a	6,49 ^a
	1	5,07 ^{ab}	1,35 ^b	0,22 ^a	6,64 ^a
	2	4,47 ^b	1,58 ^b	0,44 ^a	6,49 ^a
	4	3,83 ^{bc}	1,97 ^{bc}	0,79 ^b	6,60 ^a
	6	3,14 ^c	1,85 ^b	0,89 ^b	5,88 ^b
	8	2,31 ^d	2,04 ^c	1,84 ^c	6,19 ^{ab}
A50	0	5,68 ^a	0,57 ^a	0,24 ^a	6,49 ^a
	1	5,11 ^{ab}	1,39 ^b	0,28 ^a	6,78 ^a
	2	4,37 ^b	1,68 ^b	0,35 ^a	6,40 ^a
	4	3,97 ^b	1,91 ^{bc}	0,85 ^b	6,73 ^a
	6	3,24 ^c	2,14 ^c	1,24 ^{bc}	6,63 ^a
	8	2,58 ^d	2,26 ^c	1,35 ^c	6,20 ^a
	11	1,64 ^d	2,32 ^c	2,31 ^d	6,27 ^a
A60	0	5,68 ^a	0,57 ^a	0,24 ^a	6,49 ^a
	1	4,78 ^a	1,30 ^b	0,25 ^a	6,33 ^a
	2	5,35 ^a	1,81 ^c	0,26 ^a	7,41 ^a
	4	4,56 ^{ab}	1,93 ^c	0,79 ^b	7,28 ^a
	6	3,46 ^b	2,13 ^{cd}	1,23 ^b	6,82 ^a
	8	2,55 ^{bc}	2,42 ^d	1,23 ^b	6,20 ^a
	11	2,00 ^c	2,23 ^{cd}	2,08 ^c	6,30 ^a

(*) expresado como $\mu\text{mol/g}$; (^a), sumatorio de los compuestos de degradación del ATP. Letra diferente en superíndice en la misma columna por lote indica que existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

Dada esta estabilidad, se calcula la relación de cada catabolito del ATP predominantes sobre el sumatorio total de éstos. La evolución de estos productos se compara a lo largo del tiempo en la Imagen 91 a Imagen 93 para IMP, HxR y Hx, respectivamente.

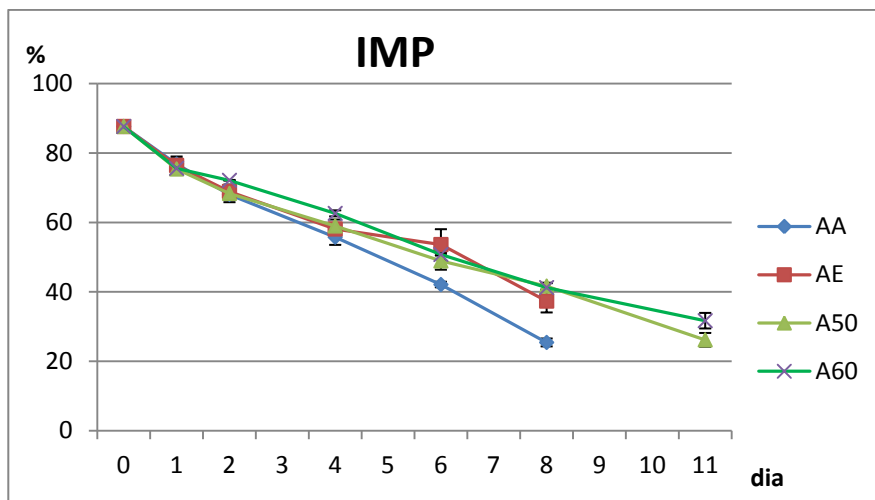


Imagen 91. Evolución del IMP durante el almacenamiento refrigerado (+4°C) de sardina en MAP.

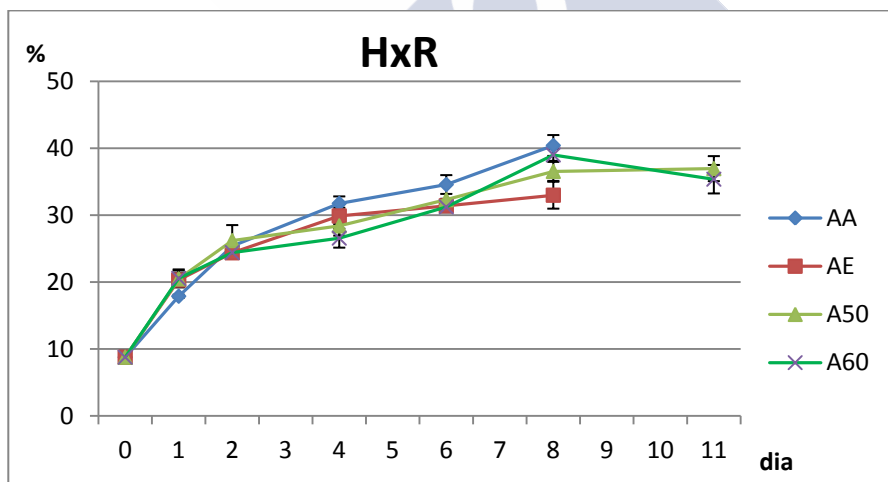


Imagen 92. Evolución de HxR durante el almacenamiento refrigerado (+4°C) de sardina en MAP

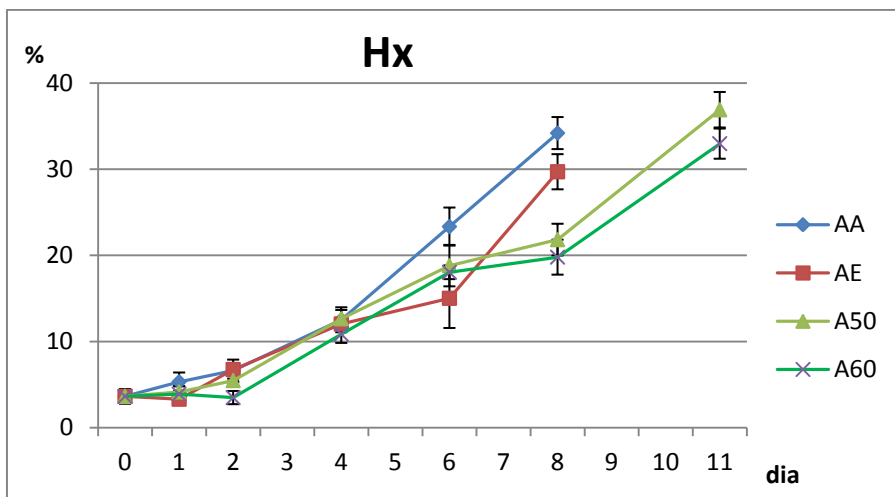


Imagen 93. Evolución de Hx durante el almacenamiento refrigerado (+4°C) de sardina en MAP

El IMP desciende de forma lineal, alcanzando un 60% en el límite de vida útil para el lote AA, que es el que desbunda significativamente del resto de a partir del día 4 lotes ($p < 0,05$), degradándose más rápido respecto al resto de lotes. En el resto de lotes, la pauta de descenso es similar ($p > 0,05$), alcanzado alrededor del 50% en el límite de aptitud sensorial para los envasados en MAP (A50 y A60). En relación a la formación de HxR, asciende rápido durante los primeros 4 días en todos los lotes, desbutando sólo el lote AA respecto al lote AE a partir del día 6 ($p < 0,05$). Durante los últimos días de estudio, la tasa de HxR en los lotes MAP se mantienen ($p > 0,05$).

Con la generación de Hx (Valor H), en el límite de aptitud, el lote AA alcanza 9,3%, mientras que para el lote AE y los MAP, en el punto de rechazo se alcanzan 12,4% y en torno al 17% de Hx, respectivamente.

En la Imagen 94, se contempla el uso del Valor K_i , como la relación de HxR + Hx, respecto a la suma de los catabolitos prioritarios en esta degradación bioquímica (IMP + HxR + Hx), un parámetro propuesto por Saito y col. (1959) como evaluador de frescura para determinadas especies.

El Valor K_i se forma más rápido en lote AA con relación a los lotes en MAP, destacando significativamente a partir del día 4, seguido del lote (AE); en el límite de aptitud alcanza casi el 40% del total de catabolitos del ATP, siendo en el caso de las muestras envasadas en MAP del 43-50% en dicho límite.

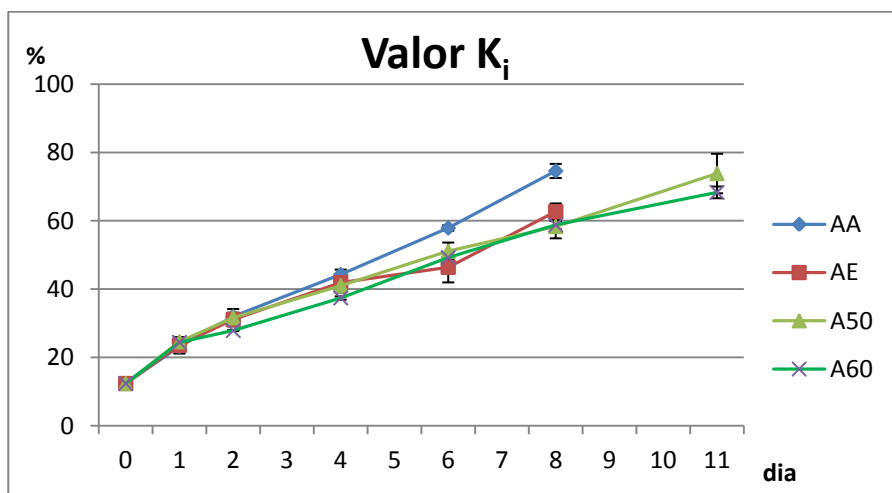


Imagen 94. Evolución del Valor K_i durante el almacenamiento refrigerado (+4°C) de sardina en MAP

Experimento B: Este ensayo fue realizado con Sardina capturada en Mayo 1993; los ejemplares (n=15) poseen una talla de $160,6 \pm 8,4$ mm, y un peso de $83,93 \pm 17,60$ g. La composición elemental fue la siguiente: humedad 72,1 %, proteínas 21,2%, lípidos 4,3% y cenizas 2,3%. Nos hallamos ante un lote con una tasa de grasa baja para lo que alcanza esta especie.

Para este ensayo se realizan 2 lotes de MAP, donde HIELO corresponde a sardina entera almacenada en condiciones de refrigeración con hielo, EPA50 tronquito envasado con $\text{CO}_2:\text{N}_2$ (50:50), y EPA75 tronquito envasado con $\text{O}_2:\text{CO}_2:\text{N}_2$ (5:75:20), almacenados en cámara fría, a $+4^\circ\text{C}$. En la Tabla 30 se exponen los valores medios de un panel de cata de 4 jueces.

Tabla 30. Análisis sensorial (valor Q) de sardina Mayo envasada en MAP a $(+4^\circ\text{C})$.

Lotes	Día de almacenamiento ($+4^\circ\text{C}$)					
	0	2	3	4	6	8
HIELO	3 ^a	2,62 ^{ab}	1,97 ^b	1,36 ^c	0,60 ^{cd}	0,2 ^d
EPA50	3 ^a	2,60 ^a	1,98 ^b	1,13 ^{bc}	0,93 ^c	0,5 ^d
EPA75	3 ^a	2,75 ^a	1,81 ^b	1,37 ^{bc}	0,75 ^c	0,4 ^c

Letra en superíndice en la misma fila indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

En este caso, el límite de vida útil es de 4 días (uno más que en el ensayo anterior, cuando la sardina tenía más grasa, ~10%), mismo valor para los lotes almacenados bajo MAP a $+4^\circ\text{C}$. La justificación sensorial es similar al experimento anterior, por lo que no se replican los comentarios.

El valor de TBA (Imagen 95), indicador de oxidación lipídica, alcanza valores más bajos que los mostrados cuando se parte de niveles de grasa superiores (experimento A) en el caso del lote control o tradicional (sardina en hielo). En los tres lotes, el desarrollo de MDA es diferente según tipo de envasado ($p < 0,05$).

En este caso la generación de MDA es baja en general, alcanzado el lote control en su límite de aptitud, 3,2 mg/kg (con 10% grasa fue de ~8 mg/kg para el mismo día). En el caso de los lotes MAP, el efecto de la presencia de bajos niveles de O_2 (EPA75) son evidentes frente a su ausencia (EPA50). EPA75 aumenta ligeramente hasta 1,39

mg/kg en su límite de aptitud, para alcanzar 3,07 al final del almacenamiento, no así el lote EPA50, que genera poco MDA hasta alcanzar 0,32 mg/kg en su vida útil y al final del almacenamiento 0,55 mg/kg.

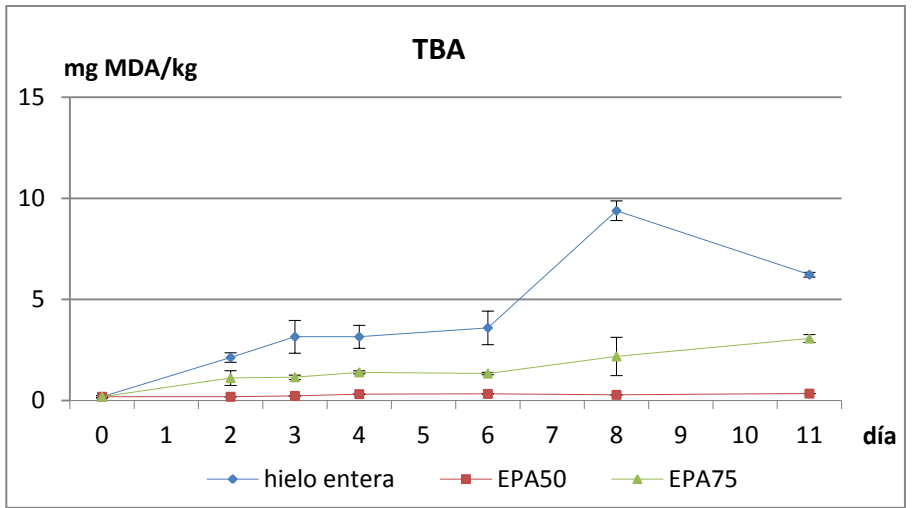


Imagen 95. Evolución del índice de TBA a lo largo del almacenamiento en MAP (4°C)

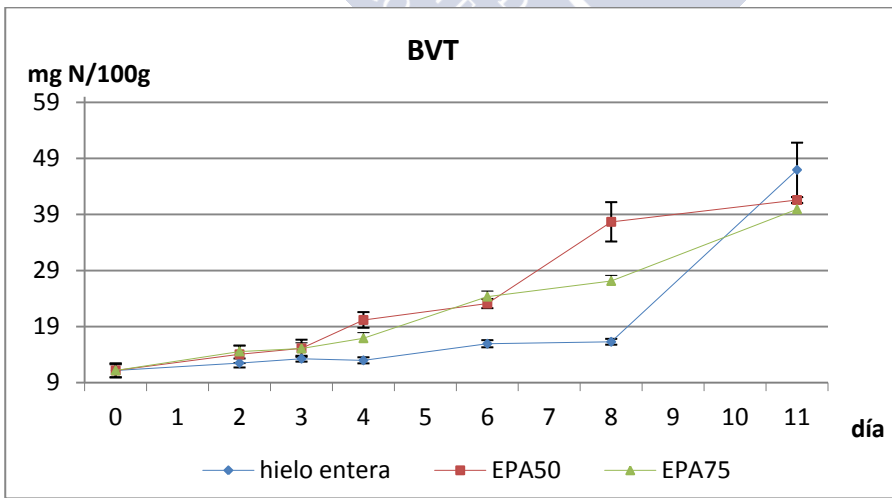


Imagen 96. Formación de BVT a lo largo del almacenamiento en MAP (4°C)

En cuanto al BVT (Imagen 96), la formación es más baja en el lote en hielo (control), aumentando más rápido en los lotes MAP a 4°C ($p<0,05$). El lote control alcanza en su límite de vida útil 12,96 mg N/100g, diferentes a los lotes MAP ($p<0,05$), con 16,90 y 2017 en el caso de los lotes EPA75 y EPA50, respectivamente ($p>0,05$).

La formación de aminas biógenas se representan de la Imagen 97 a Imagen 104, para PUT, TYR, CAD, HIS, AGM, PHE, SPN y SPA, respectivamente. En general, la formación de aminas es similar entre los lotes MAP, mientras que el lote control se diferencia significativamente al menos en los primeros 8 días, destacando por una tasa de formación de HIS baja. Por lote, y hasta el final del estudio, en el lote control predomina de mayor a menor tasa:

$$\text{CAD} > \text{TYR} \geq \text{AGM} \geq \text{PUT} > \text{HIS} > \text{PHE},$$

mientras que SPA se mantiene constante (en torno a 7 ppm), pero la SPN muestra un aumento ligero desde 3,2 hasta 7,4 ppm al 11° día.

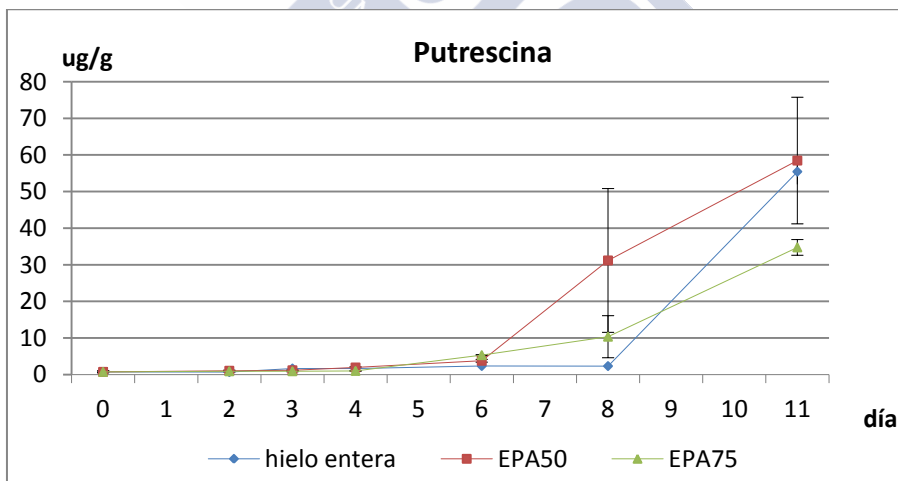


Imagen 97. Formación de PUT a lo largo del almacenamiento (4°C)

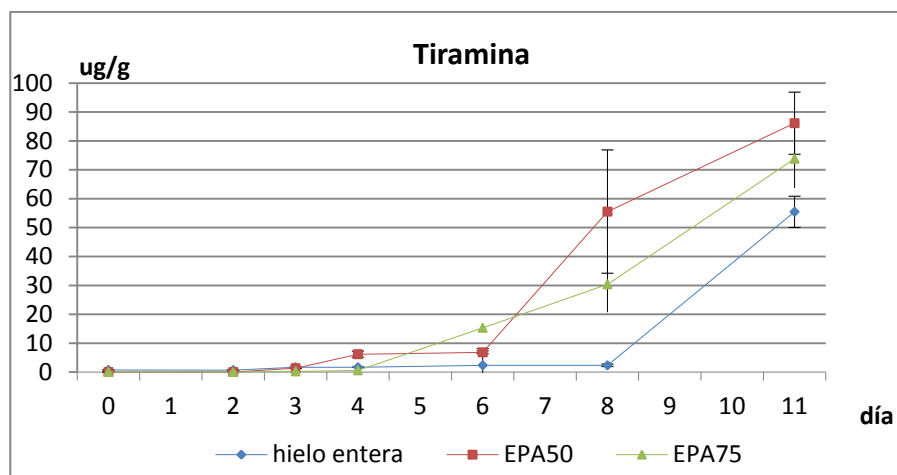


Imagen 98. Formación de TYR a lo largo del almacenamiento (4°C)

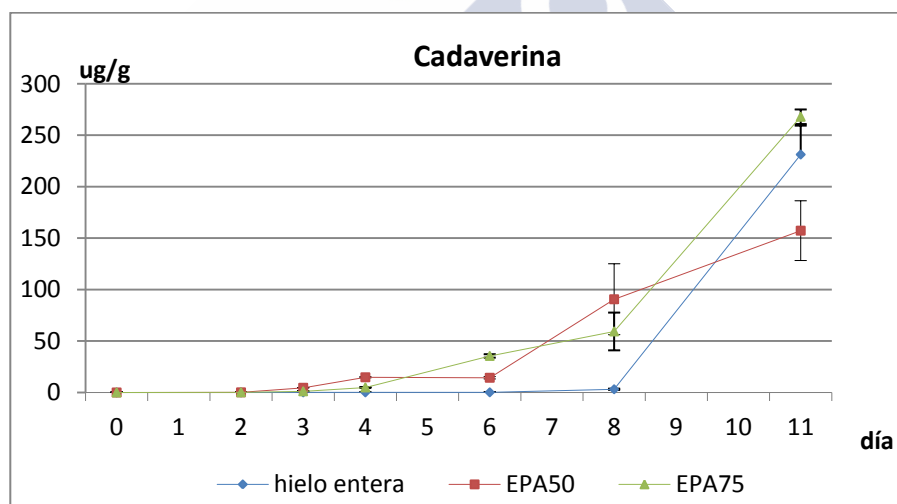


Imagen 99. Formación de CAD a lo largo del almacenamiento (4°C)

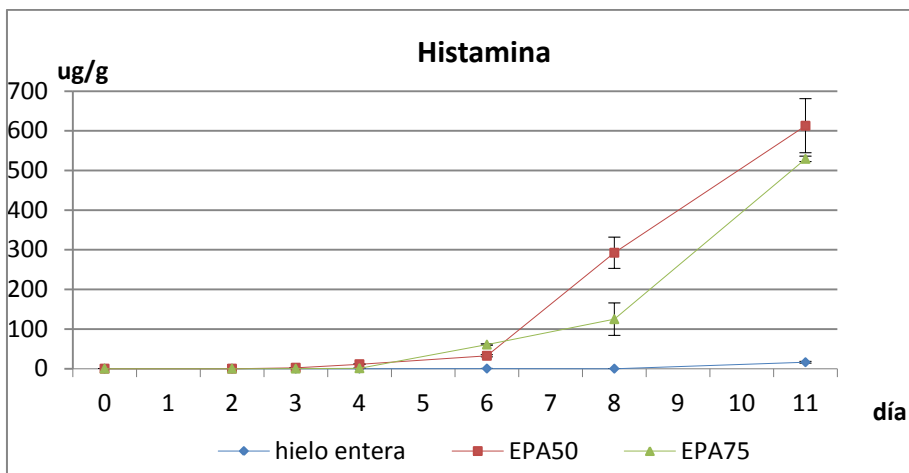


Imagen 100. Formación de HIS a lo largo del almacenamiento (4°C)

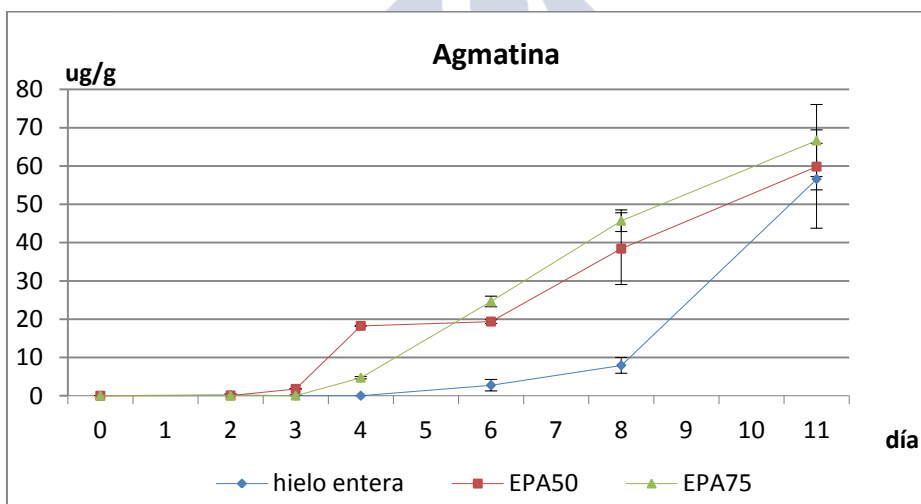


Imagen 101. Formación de AGM a lo largo del almacenamiento (4°C)

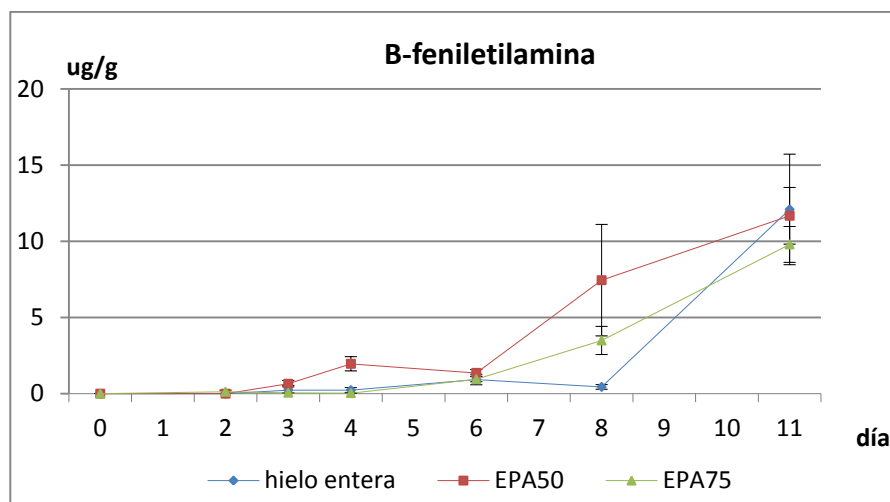


Imagen 102. Formación de PHE a lo largo del almacenamiento (4°C)

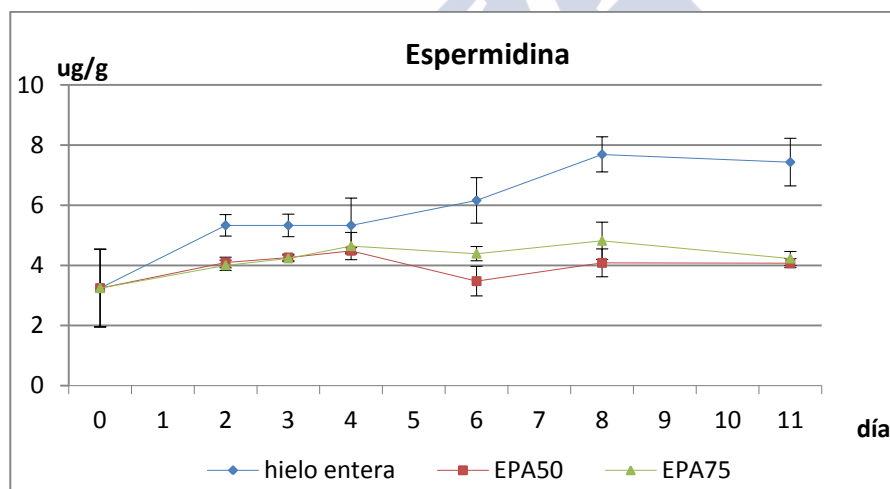


Imagen 103. Formación de SPN a lo largo del almacenamiento (4°C)

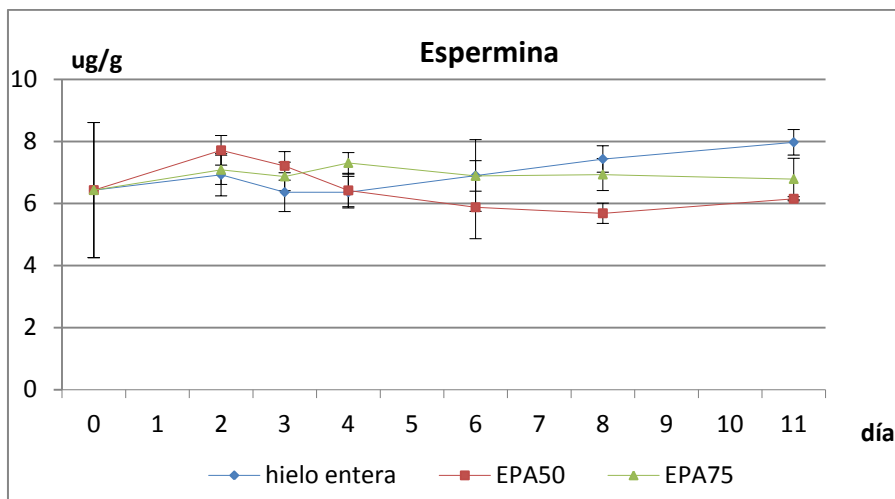


Imagen 104. Formación de SPA a lo largo del almacenamiento (4°C)

En el caso del lote EPA50, predomina la formación de:

$$\text{HIS} > \text{CAD} > \text{TYR} > \text{AGM} \geq \text{PUT} > \text{PHE},$$

la SPN y SPA se mantienen constantes. Por último, el lote EPA75 sigue la misma pauta que EPA50, pero con menor tasa de PUT.

En el caso del límite de vida útil, el lote control (entera en hielo) presenta 1,66 ppm PUT, 0,07 ppm CAD, 5,33 ppm SPN y 6,36 ppm SPA. Para lote EPA50, 1,94 ppm PUT, 14,75 ppm CAD, 11,26 ppm HIS, 18,24 ppm AGM, 6,18 ppm TYR, 4,48 ppm SPN y 6,42 ppm SPA. Por último, el lote EPA75, en su vida útil presenta 1 ppm PUT, 4,86 ppm CAD, 1,03 ppm HIS, 4,69 ppm AGM, 0,58 ppm TYR, 4,64 ppm SPN y 7,30 ppm SPA.

A la vista de los resultados, la generación más importante de aminas en el límite de vida útil (4 días) tiene lugar en ausencia de oxígeno, es decir, en el lote EPA50, y a partir de este día, los valores se disparan en todos los casos, pero de forma similar en los lotes MAP ($p > 0,05$). En el caso de los MAP, destaca la formación de CAD, estableciendo un rango de entre 5 y 10 ppm como nivel de rechazo. La presencia de AGM e HIS por encima de los 5 $\mu\text{g/g}$ son indicadores de

alteración bacteriana, y a partir de estos niveles, su formación es logarítmica en el tiempo, por lo que su alcance a niveles tóxicos (100 µg/g en el caso de HIS) y en condiciones de refrigeración a +4°C, se estima en 2-3 días más (depende de la época de captura y flora asociada). Si la cadena de frío se rompe, el riesgo sanitario está presente en breve periodo de tiempo (horas).

EXPERIMENTO C: Este ensayo realizado con Sardina de Julio 1993; los ejemplares (n=15) poseen una talla de 164,8±9,0 mm, y un peso de 60,47±9,20 g. La composición básica fue la siguiente: humedad 66,85 %, proteínas 19,07%, lípidos 13,34% y cenizas 1,64%.

Para este ensayo se realizan 2 lotes de MAP, donde HIELO corresponde a sardina entera almacenada en condiciones de refrigeración con hielo, EPA50 tronquito envasado con CO₂:N₂ (50:50), y EPA75 tronquito envasado con O₂:CO₂:N₂ (5:75:20), almacenados en cámara fría, a +2°C. En la Tabla 31 se exponen los valores medios de un panel de cata de 4 jueces.

Tabla 31. Valor Q medio obtenido para sardina almacenada en MAP (+2°C).

LOTE	Días de almacenamiento 2°C						
	0	2	3	4	6	8	11
Hielo	3	2,41	2,05	1,32	1,15	0,72	0
EPA50	3	2,33	1,54	1,64	0,90	0,87	0,50
EPA75	3	2,55	1,97	1,60	1,15	0,68	0,33

De acuerdo al análisis sensorial, el panel de cata ofrece una vida útil para sardina en hielo de 6 días, 4-5 para el EPA50 y 6 para el EPA75. La justificación sensorial es similar al experimento anterior, por lo que no se replican los comentarios, con la excepción de que a pesar de mayor contenido graso (13%), a esta temperatura de almacenamiento y para 2°C, se gana 2 días más respecto al envasado en hielo, y lo mismo para el caso del almacenamiento en EPA75 con respecto al Experimento B a 4°C para esta misma fórmula gaseosa. El límite de rechazo en el lote EPA50 se asocia a olores agrios, y sabores ligeramente astringentes y ácidos, mientras que en el lote en hielo

predominan sabores a aminas, y olor mezcla de rancidez (sobre todo en fresco) y especialmente intenso a aminas. En el lote EPA75, el descriptor a rancidez es más ligero que en hielo, pero con notas intensas a aminas.

Como en anteriores ocasiones, el índice de TBA (Imagen 105) refleja la evolución de la rancidez, con una evolución similar en lotes Hielo y EPA75 los primeros 4 días, para aumentar drásticamente en el lote Hielo ($p<0,05$) a partir del 5º día, alcanzando en el límite de vida útil, 2,6 mg MDA/kg, mientras que el lote EPA75 se mantiene en torno a 2 mg MDA/kg. Como ocurría en el Experimento B a 4°C, el lote EPA50 se mantiene en torno a los 0,5 mg MDA/kg hasta el final del ensayo. Así, y para la semana de almacenamiento, a esta temperatura, la tasa de formación de MDA ha sido más lenta que a 4°C en EPA75 y Hielo.

En el caso de las BVT (Imagen 106), la tasa de formación ha sido más baja para estas mezclas gaseosas que en el caso de almacenamiento de 4°C, alcanzando en los lotes MAP a día 11, en torno a 19 mg N/100g, cuando a 4°C se alcanzaban ya al 4º día. En cualquier caso, la formación de BVT va pareja en ambos lotes MAP ($p>0,05$) con una generación menor en el caso de lote en Hielo ($p<0,05$).

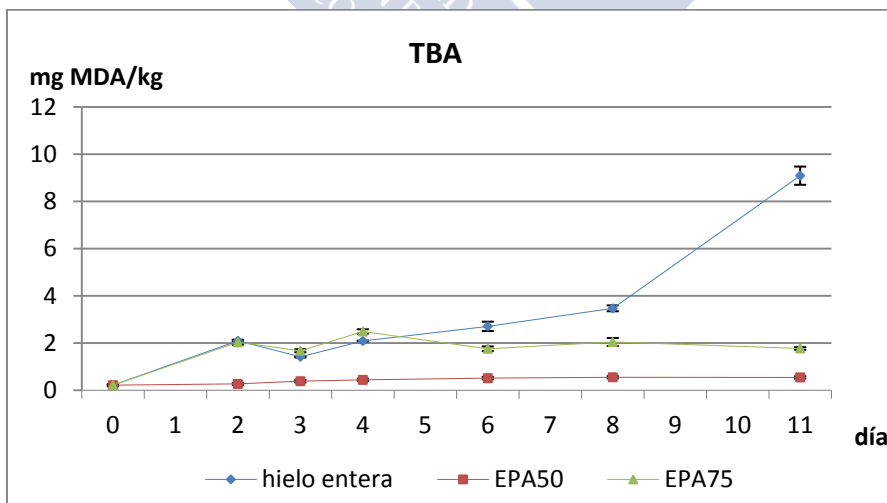


Imagen 105. Evolución de TBA a lo largo del tiempo de almacenamiento (2°C).

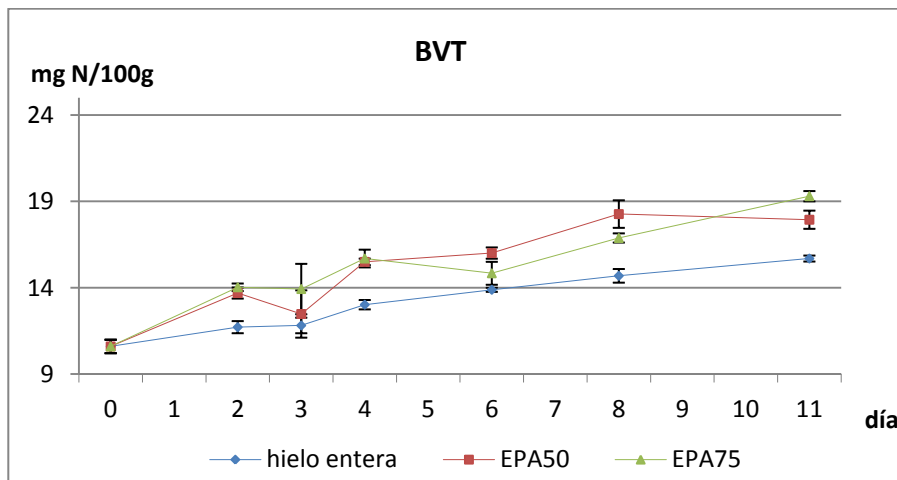


Imagen 106. Formación de BVT a lo largo del tiempo de almacenamiento (2°C).

La formación de TMA (Imagen 107) es pareja en lotes MAP (por encima del lote en hielo), pero a partir del 3° día, el lote EPA50 asciende ligeramente hasta el 8° día respecto a demás lotes ($p < 0,05$), para ser sobrepasado por EPA75 al cabo de 11 días, probablemente por un cambio de la flora bacteriana en la atmósfera gaseosa hacia el final del estudio, potenciando a organismos capacitados para sobrevivir a las tasas elevadas de CO_2 (75% inicial).

En cuanto a la formación de aminas biógenas (Imagen 108 a Imagen 115), la formación de PUT, se mantiene baja en relación al mismo almacenamiento a 4°C, destacando el lote Hielo, con 2,5 ppm al término de su vida útil. Con SPN y SPA, ocurre algo similar al Experimento B a 4°C, se mantienen en todos los casos y lotes salvo para SPN en el lote en Hielo, que aumenta ligeramente hasta el final y por encima de los lotes en MAP ($p < 0,05$).

En cuanto al resto de aminas, destacan hacia el final del estudio, la generación de CAD, que alcanzan en torno a 20 ppm, especialmente en lote EPA50, distanciándose ($p < 0,05$) del lote EPA75 (9 ppm) y finalmente Hielo (2 ppm). Con la AGM pasa algo similar, pero despunta al final con 20 ppm en el lote EPA75 ($p < 0,05$). En cualquier

caso, en los 3 lotes y para estas aminas, en el límite de aptitud su tasa es inferior a 5 ppm.

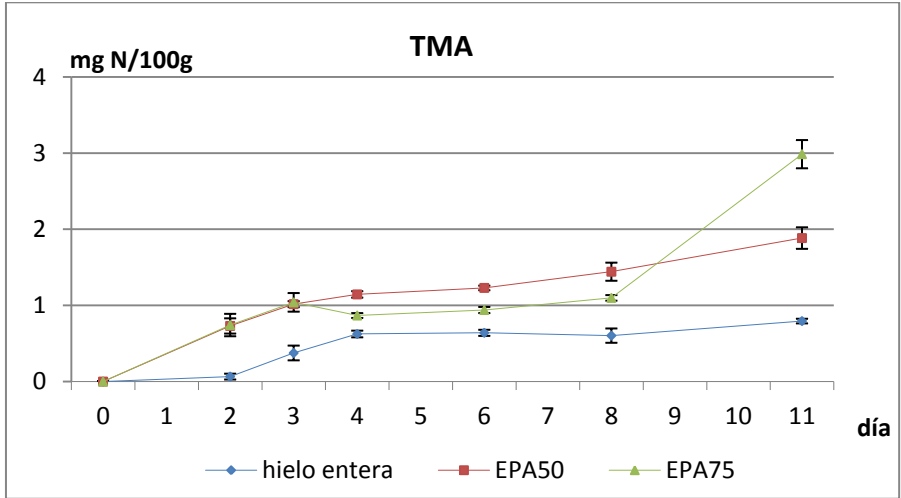


Imagen 107. Formación de TMA a lo largo del tiempo de almacenamiento (2°C).

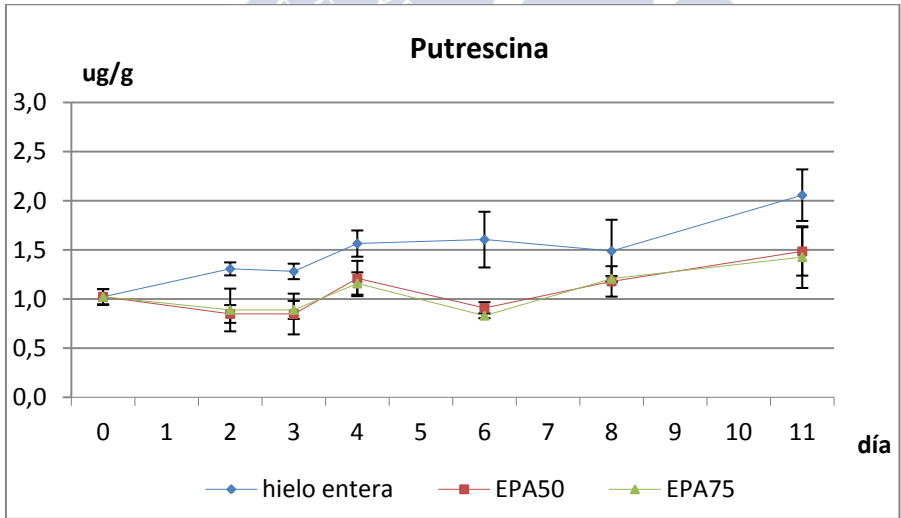


Imagen 108. Formación de PUT a lo largo del tiempo de almacenamiento (2°C).

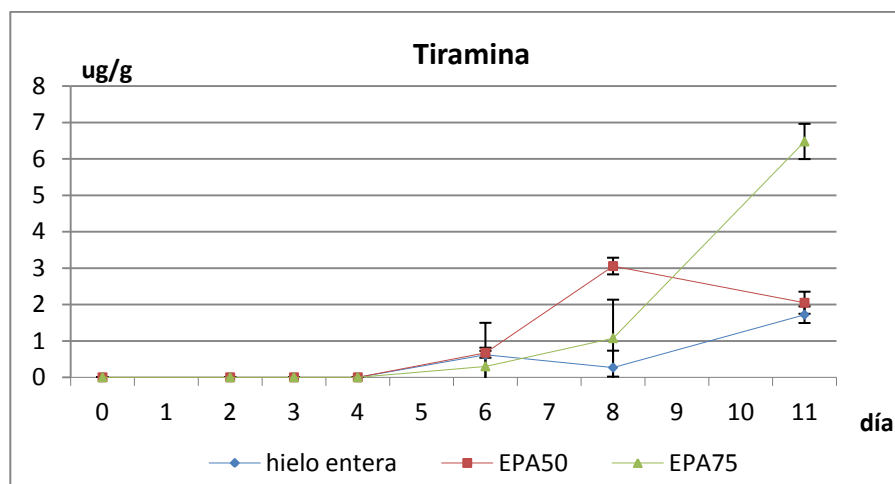


Imagen 109. Formación de TYR a lo largo del tiempo de almacenamiento (2°C).

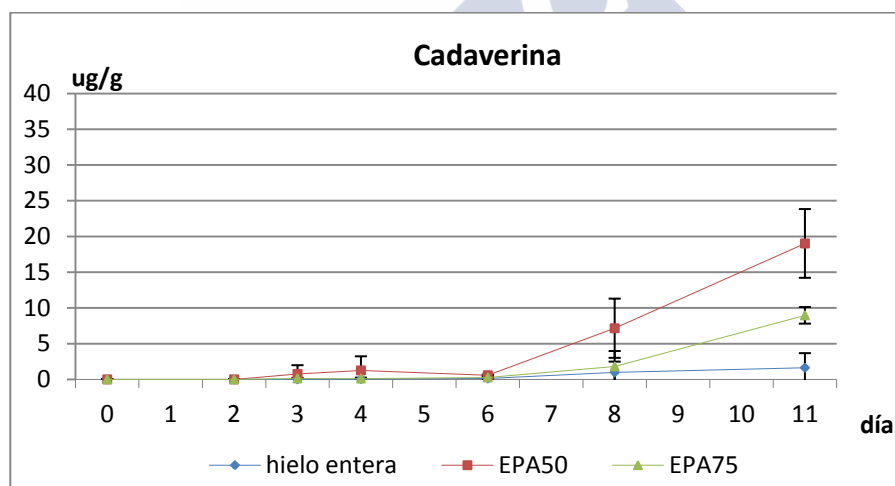


Imagen 110. Formación de CAD a lo largo del tiempo de almacenamiento (2°C).

En el caso de la HIS, su formación es baja, testimonial, alcanzando en torno a las 4 ppm al 11° día en los lotes MAP ($p < 0,05$), siendo menor en el lote en Hielo; al igual que la PHE, con unos

valores que no muestran diferencias significativas entre los lotes durante su evolución hasta el límite de aptitud.

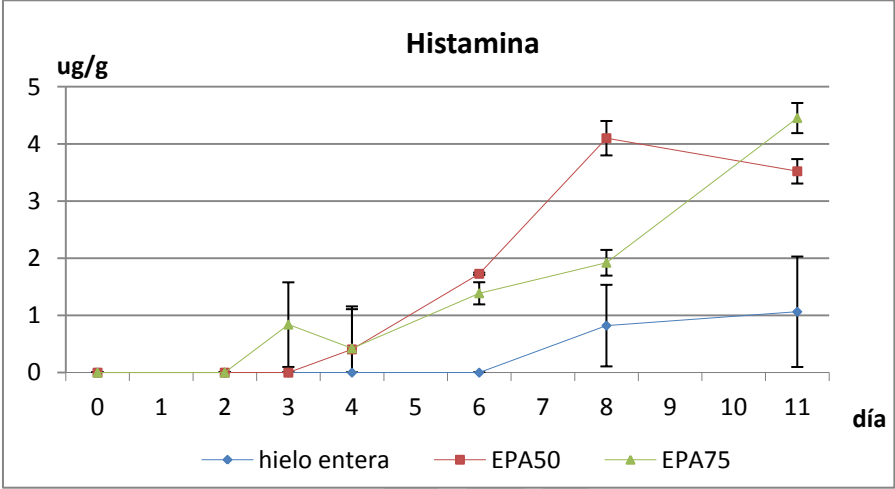


Imagen 111. Formación de HIS a lo largo del tiempo de almacenamiento (2°C).

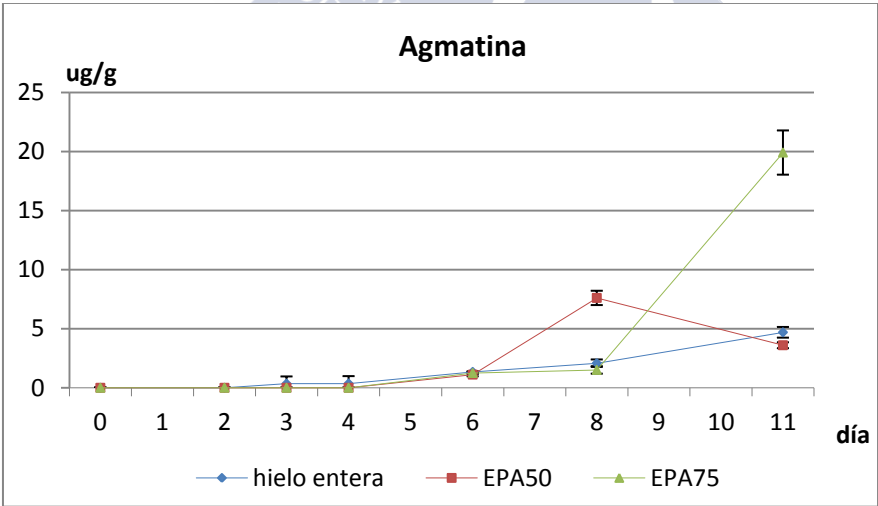


Imagen 112. Formación de AGM a lo largo del tiempo de almacenamiento (2°C).

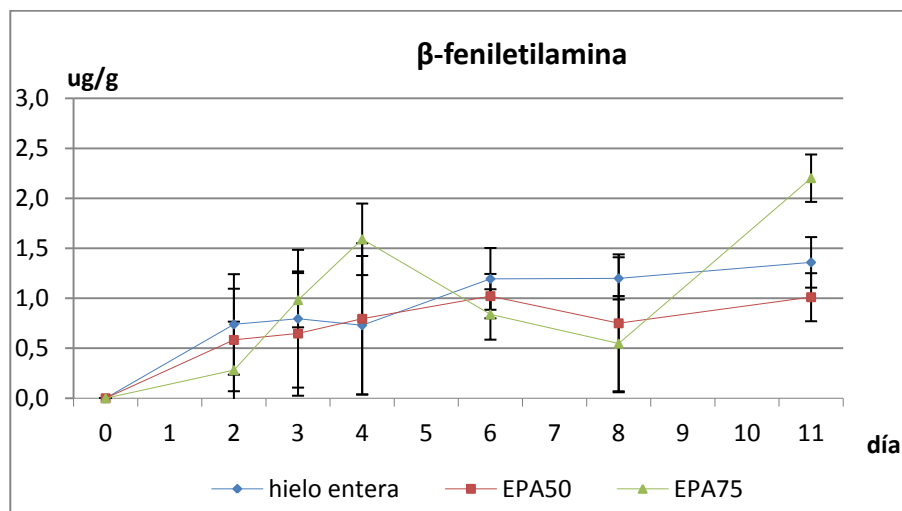


Imagen 113. Formación de PHE a lo largo del tiempo de almacenamiento (2°C).

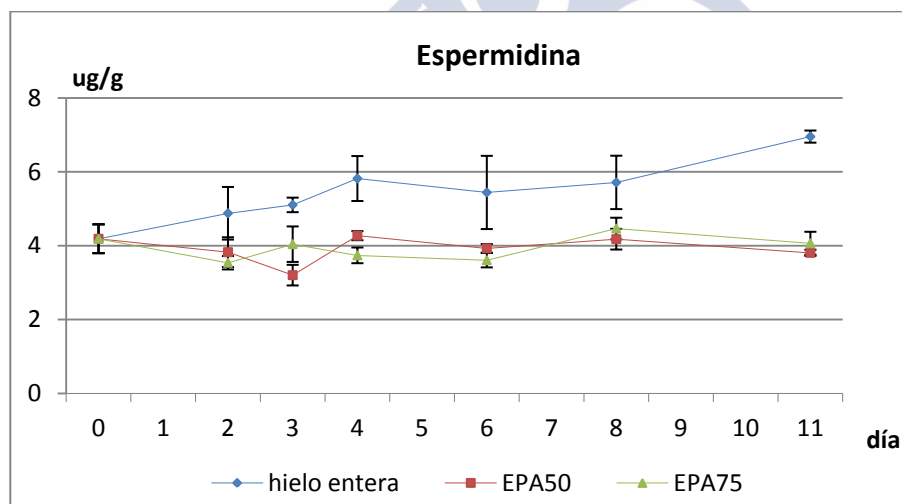


Imagen 114. Formación de SPN a lo largo del tiempo de almacenamiento (2°C).

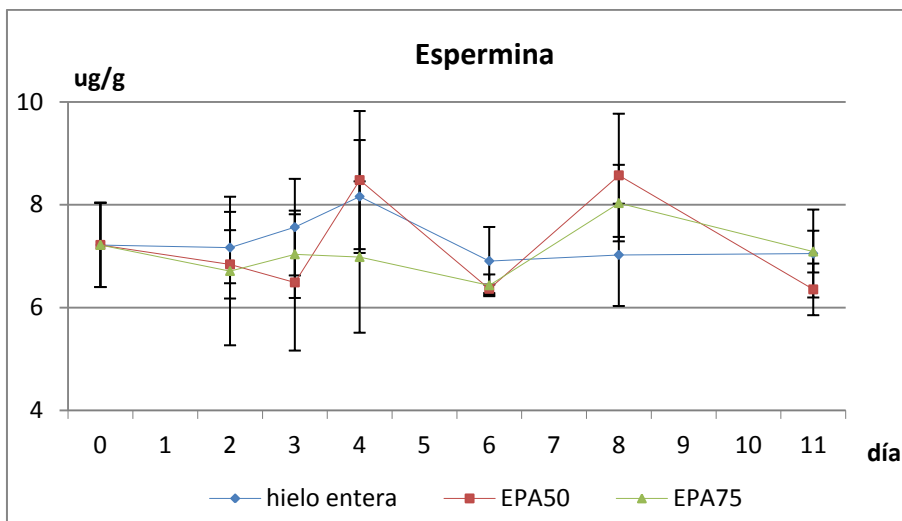


Imagen 115. Formación de SPA a lo largo del tiempo de almacenamiento (2°C).

Como resumen, en condiciones de bajas temperaturas de refrigeración (2°C) y comparando con el Experimento B a 4°C, la flora bacteriana en el lote en hielo hace que predomine la formación de PUT y SPN, mientras que en los lotes MAP predomina la formación del resto de aminas, con especial interés la CAD, AGM y TYR, esta última muy similar a la formación de HIS.

EXPERIMENTO D: Este ensayo realizado con Sardina de Marzo 1994; los ejemplares (n=15) poseen una talla de $167,3 \pm 1,4$ mm, y un peso de $58,01 \pm 15,28$ g. La composición básica fue la siguiente: humedad 78,3 %, proteínas 17,2%, lípidos 2,81% y cenizas 2,0%.

Para este ensayo se realizan 2 lotes de MAP, donde HIELO corresponde a sardina entera almacenada en condiciones de refrigeración con hielo, EPA60 tronquito envasado con CO₂:N₂ (40:60), y EPA20 tronquito envasado con CO₂:N₂ (80:20), y un último lote de tronquito envasado en AIRE, almacenados en cámara fría, a +4°C. En la Tabla 32 se exponen los valores medios de un panel de cata de 5 jueces.

Tabla 32. Valor Q medio de sardina almacenada en MAP a 4°C.

LOTE	Días de almacenamiento					
	0	2	3	5	6	7
Hielo	3	1,99	1,50	1,05	0,13	0,02
EPA60	3	2,14	1,84	1,10	0,88	0,29
EPA20	3	1,98	1,52	0,93	0,49	0,03
Control aire	3	1,78	1,55	0,64	0,42	0,02

Como en anteriores ocasiones, con esta tasa inicial de grasa baja (similar a Experimento B, con un 2% más) a la misma temperatura, el límite de aptitud del lote en HIELO se sitúa en los 5 días. El lote EPA60 con un límite igual (5 días), y el lote EPA20 perdería un día más, por un mayor sabor ácido y agrio, y olor extraño, con toques azufrados y amoniacal. El lote en AIRE es el peor evaluado, con notas ligeramente rancias en olor (y olor secundario ligeramente amoniacal), y sabor agrio, ligeramente astringente.

Dada la baja tasa de grasa, la formación del MDA (índice TBA, Imagen 116) en el tiempo es baja, comparada con lotes de mayor tasa de grasa (julio). En este caso, es evidente el efecto positivo de los MAP en evitar la generación de MDA, oxidación lipídica a lo largo de casi una semana de almacenamiento (ambos sin diferencias significativas). La TBA aumenta significativamente hasta 6 mg MDA/kg al 5º día en el lote AIRE para descender hasta el final ($p < 0,05$). Al igual que el lote en HIELO, que aumenta significativamente hasta los 3 ppm, para mantenerse hasta el final ($p > 0,05$). En estos 2 casos, en el límite de vida útil, se alcanzan los 3 mg MDA/kg, con una buena correlación, con $R^2 = 0,9926$ y $R^2 = 0,9980$ para el lote HIELO y AIRE, respectivamente.

La formación de aminas volátiles, BVT (Imagen 117), aumenta a partir del 3º día en todos los casos a excepción del lote HIELO, con un aumento significativo en los lotes a 4°C, y distinto entre ellos, siendo superior en el lote en AIRE, seguido por el lote EPA20 y EPA60. En el límite de vida útil, el lote Hielo ronda los 12 mg N/100g, y 18 mg N/100g en el caso del lote EPA60. En el caso de AIRE y EPA20 alcanza 14-15 mg N/100g.

El caso del TMA (Imagen 118) sigue la misma pauta de aumento significativo y en el mismo orden que BVT. En el límite de vida útil, el lote en HIELO alcanza 1,8 mg N/100g; 7,4 mg N/100g en el caso de EPA60, 2,5 y 3,3 mg N/100g en el caso de EPA20 y AIRE, respectivamente. En el caso del máximo alcanzado de TMA en lote AIRE (35 mg N TMA/100g), nos sugiere que en primavera, y en este año concreto, los niveles iniciales de OTMA son altos, sin se compara con el lote en aire del Experimento A.

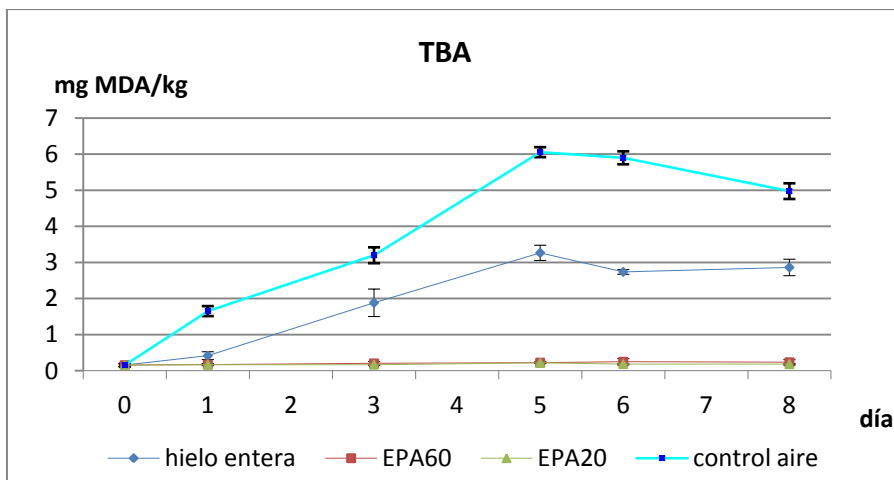


Imagen 116. Evolución del índice de TBA en sardina almacenada en MAP (4°C).

En cuanto a la formación de aminas biógenas (Imagen 119 a Imagen 126), SPN y SPA permanecen constantes a lo largo del periodo de ensayo para todos los lotes ($p > 0,05$). Destaca en el lote AIRE, la formación de CAD con 160 ppm al final del ensayo, seguido de HIS 120 ppm, PUT 60 ppm, siempre por encima del resto de lotes ($p < 0,05$); y curiosamente, en este caso, la AGM se halla en bajas tasas, la más baja respecto al resto de lotes (< 10 ppm). Este comportamiento en la generación de las aminas en este caso, indica que hay un cambio en la flora bacteriana respecto a otros meses, para este mismo periodo.

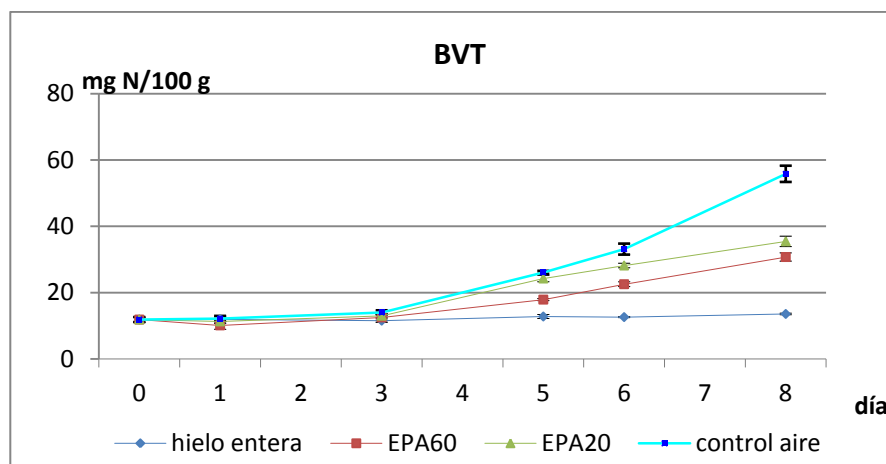


Imagen 117. Formación de BVT en sardina almacenada en MAP (4°C).

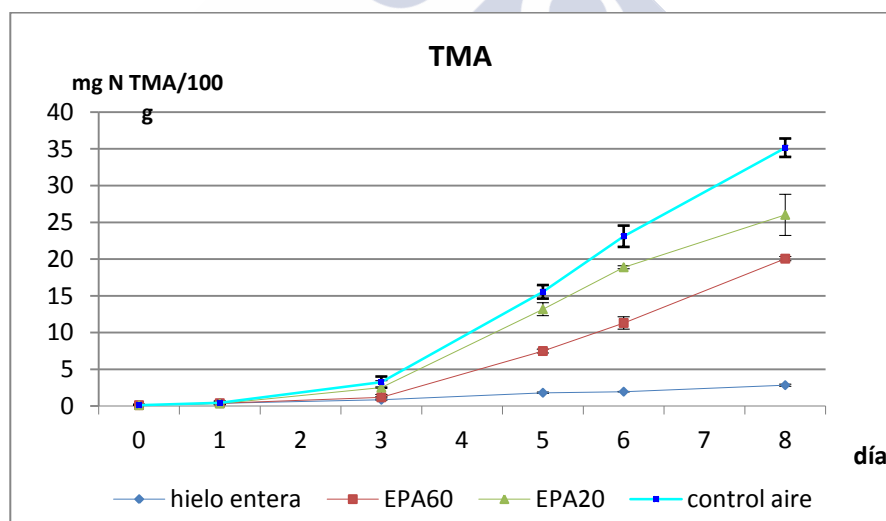


Imagen 118. Formación de TMA en sardina almacenada en MAP (4°C).

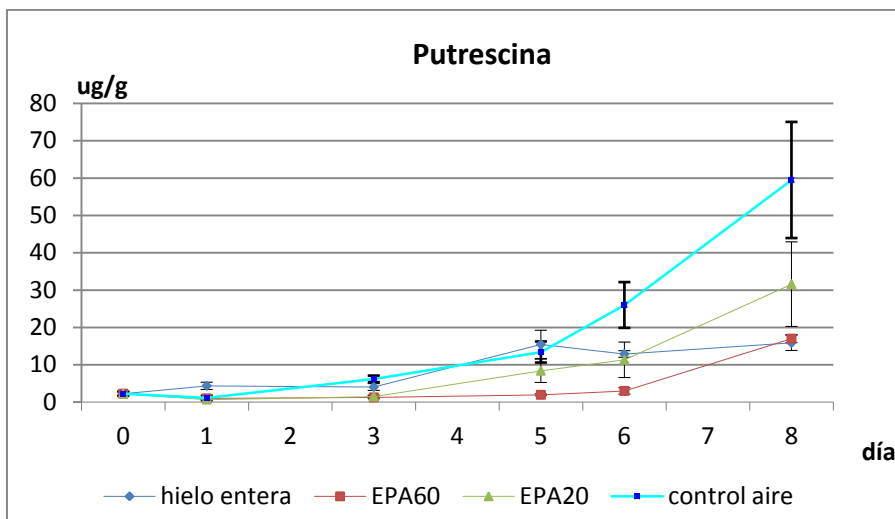


Imagen 119. Formación de PUT en sardina almacenada en MAP (4°C).

En este momento, se evalúa la generación de cada amina. En el límite de vida útil, HIELO alcanza 16 ppm de PUT, 2 ppm en el caso de EPA60, 1,8 y 6,2 ppm en EPA20 y AIRE, respectivamente.

El lote EPA20, con tasa de CO₂ de 80%, favorece una flora bacteriana que genera TYR, seguido por los lotes envasados en aerobiosis (AIRE y HIELO). Por último se halla el lote EPA60. El lote en HIELO, en el límite de aptitud alcanza ~11 ppm, mientras que el resto de lotes no sobrepasa de los 5 ppm.

La CAD alcanza los 10 ppm en lotes HIELO, EPA60, 4,5 en el lote EPA20 y 12 ppm en el lote AIRE. En cuanto a la HIS, que domina a lo largo del almacenamiento en el lote AIRE ($p < 0,05$) con 6 ppm al límite de aptitud, le siguen EPA20, HIELO y EPA60 con 3 ppm en dicho límite.

La AGM asciende rápido hasta el día 5 con 37 ppm en el lote EPA20, para descender al final hasta 29 ppm; le sigue el lote EPA60, que sólo sufre un ascenso significativo a día 5 (en su límite de aptitud con 22 ppm), aunque llega hasta los 31 ppm a día 8. En aerobiosis, su formación es más lenta, con menos de 10 ppm en lote HIELO y AIRE al límite de su aptitud.

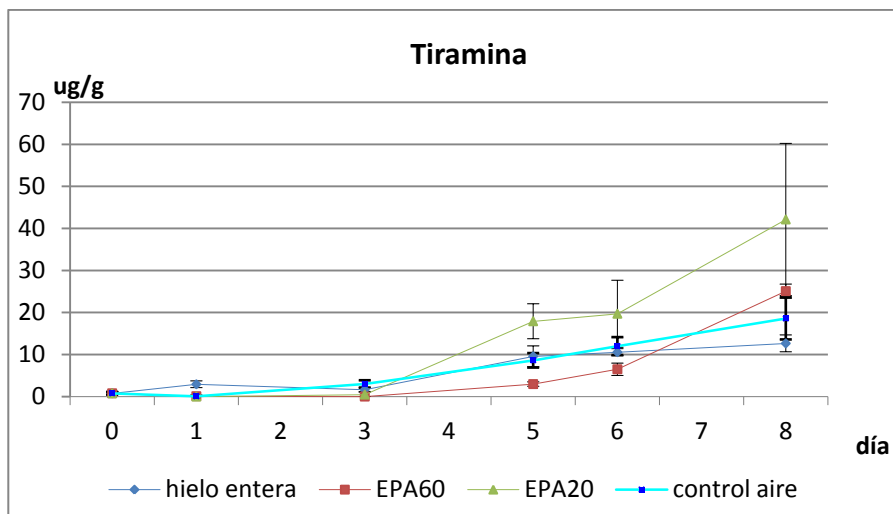


Imagen 120. Formación de TYR en sardina almacenada en MAP (4°C).

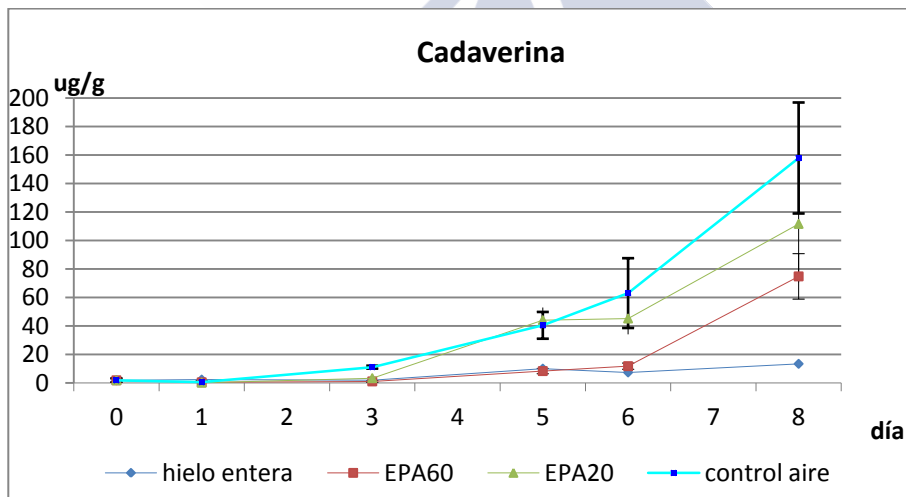


Imagen 121. Formación de CAD en sardina almacenada en MAP (4°C).

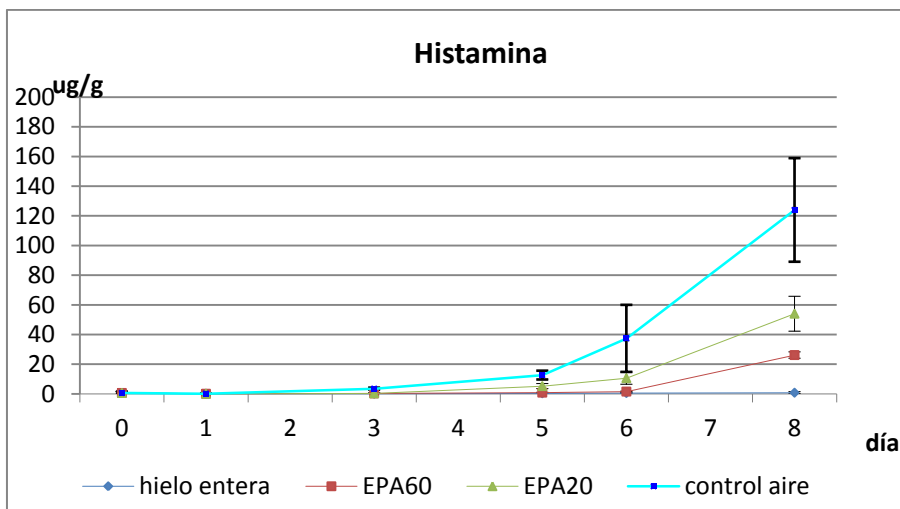


Imagen 122. Formación de HIS en sardina almacenada en MAP (4°C).

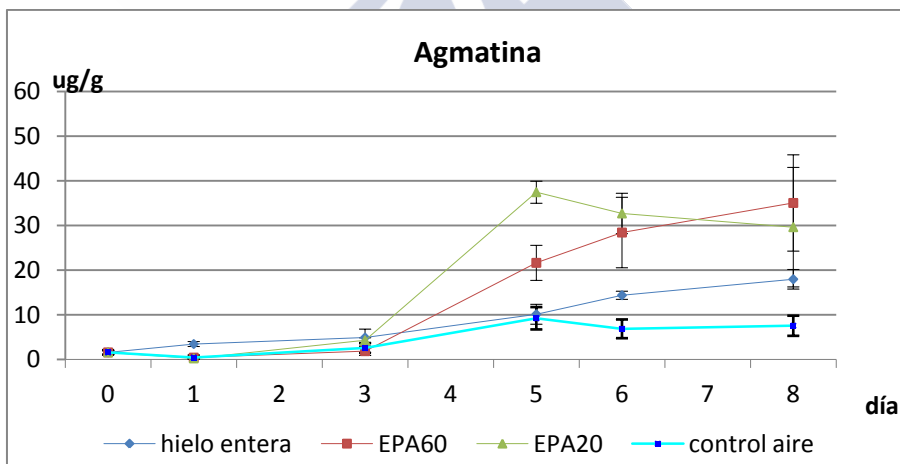


Imagen 123. Formación de AGM en sardina almacenada en MAP (4°C).

La PHE asciende más rápido en el lote EPA para alcanzar los 20 ppm en relación a los otros lotes (pero no se aprecian diferencias significativas a lo largo del estudio), si bien en el límite de aptitud de todos los lotes no sobrepasa de 1 ppm.

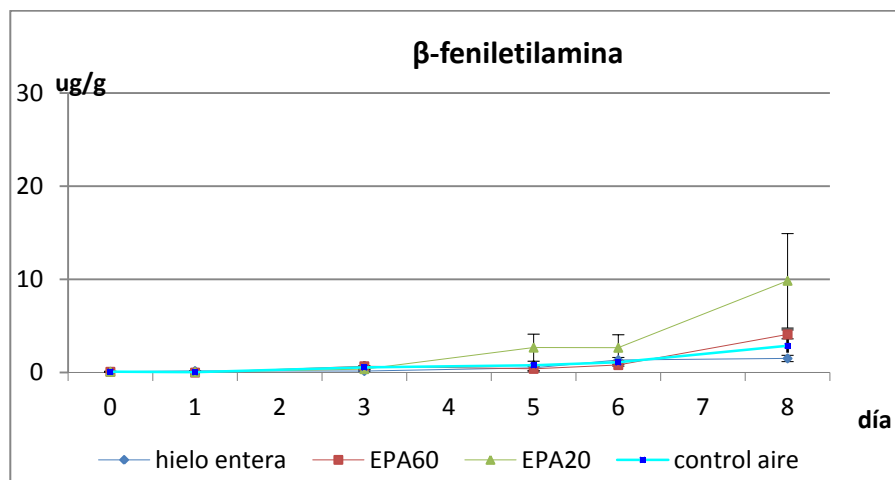


Imagen 124. Formación de PHE en sardina almacenada en MAP (4°C).

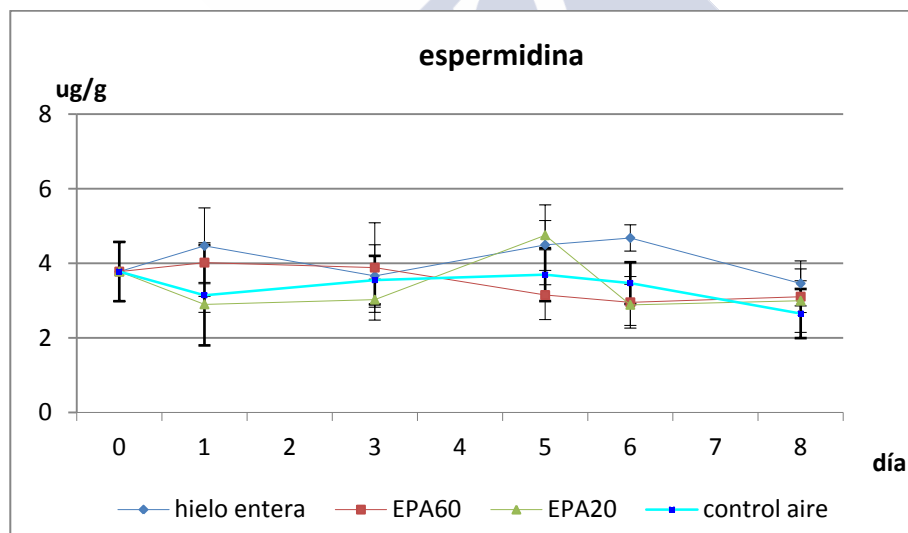


Imagen 125. Formación de SPN en sardina almacenada en MAP (4°C).

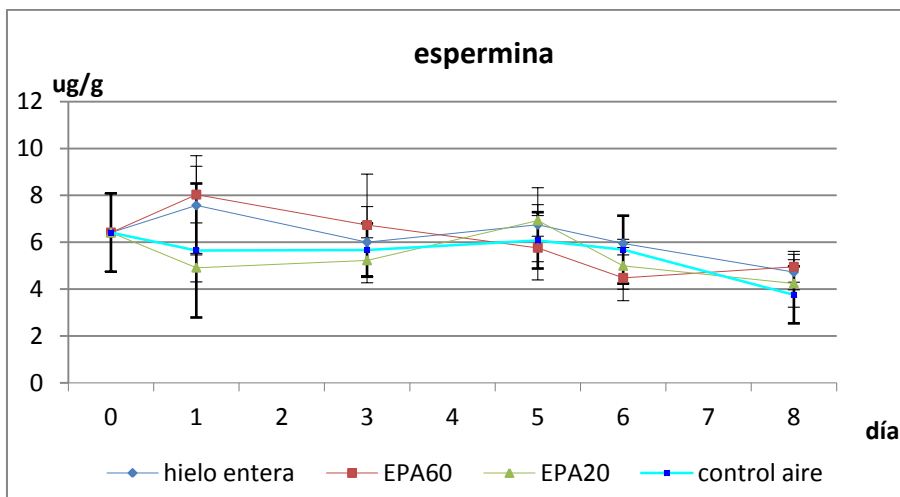


Imagen 126. Formación de SPA en sardina almacenada en MAP (4°C).

La formación de catabolitos del ATP se exponen en la Tabla 33 . La degradación del AMP es rápida, no permaneciendo más de un día en el caso del almacenamiento a°C, salvo el lote en HIELO, que alcanza los 3 días con trazas. El catabolito dominante durante el almacenamiento en HIELO es el IMP que sufre un descenso continuo ($p < 0,05$) con la consiguiente formación de HxR, que aumenta hasta el día 5 para mantenerse, aparentemente, pues mientras el IMP alimenta su tasa, parte deriva a la formación de Hx, que aumenta levemente.

En el caso de los lotes en MAP, la evolución de IMP y HxR es similar en ambos, pero con una liegra degradación significativa del IMP y en la formación de Hx en lote EPA20. Diferencia mucho más clara en el lote AIRE, donde prácticamente se consume todo el IMP, con una transformación casi total en Hx. Partiendo de la base de que la formación de Hx tiene en parte una actuación bacteriana, estos resultados, en todos los lotes, se cumplen con la evolución de aminos biógenos y la formación de TMA y BVT, y que es mucho más agresiva en el lote AIRE que en el resto de lotes.

Si bien, a partir del día 1 y hasta el final del estudio, el sumatorio de los catabolitos del ATP (Imagen 127) muestran una tendencia a la baja, ésta no es significativa, salvo en el lote AIRE, pero son unas

diferencias muy pequeñas, por lo que aparentemente no se aprecian pérdidas de nucleótidos. La explicación a la bajada significativa del lote AIRE, y en base al resto de análisis que evalúan la actividad bacteriana, sugieren una transformación parcial de Hx a xantina (no evaluada).

Tabla 33. Contenido en 5´-nucleótidos y purinas de degradación del ATP, en muestras de sardina almacenadas a +4°C.

LOTE	DIA	AMP*	IMP*	HxR*	Hx*
Hielo	0	0,09±0,01 ^a	5,13±0,05 ^a	0,70±0,08 ^a	0,50±0,08 ^a
	1	0,07±0,01 ^b	4,74±0,24 ^b	0,67±0,07 ^a	0,51±0,11 ^a
	3	0,05±0,00 ^c	3,67±0,14 ^c	1,39±0,09 ^b	0,40±0,03 ^a
	5	0,00	3,19±0,17 ^d	1,66±0,09 ^c	0,71±0,09 ^b
	6	0,00	2,87±0,10 ^e	1,80±0,06 ^c	0,89±0,07 ^b
	8	0,00	2,18±0,07 ^f	1,68±0,10 ^c	0,88±0,10 ^b
EPA60	0	0,09±0,01 ^a	5,13±0,05 ^a	0,70±0,08 ^a	0,50±0,08 ^a
	1	0,04±0,00 ^b	4,10±0,16 ^b	1,05±0,05 ^b	0,40±0,05 ^a
	3	0,00	3,58±0,06 ^c	1,61±0,09 ^c	0,47±0,05 ^a
	5	0,00	2,56±0,21 ^d	2,02±0,22 ^d	1,02±0,36 ^b
	6	0,00	2,67±0,34 ^e	2,15±0,34 ^d	1,25±0,17 ^b
	8	0,00	1,30±0,15 ^f	1,83±0,07 ^d	2,40±0,19 ^c
EPA20	0	0,09±0,01 ^a	5,13±0,05 ^a	0,70±0,08 ^a	0,50±0,08 ^a
	1	0,04±0,01 ^b	3,96±0,15 ^a	1,31±0,08 ^b	0,41±0,04 ^a
	3	0,00	3,42±0,29 ^b	1,79±0,14 ^c	0,51±0,07 ^a
	5	0,00	2,10±0,32 ^c	1,76±0,12 ^c	1,09±0,11 ^b
	6	0,00	1,38±0,50 ^c	1,98±0,03 ^d	1,89±0,15 ^c
	8	0,00	0,97±0,08 ^d	1,45±0,13 ^b	3,49±0,16 ^d
Control aire	0	0,09±0,01 ^a	5,13±0,05 ^a	0,70±0,08 ^a	0,50±0,08 ^a
	1	0,06±0,01 ^b	4,84±0,23 ^a	1,16±0,11 ^b	0,42±0,11 ^a
	3	0,00	3,08±0,34 ^b	1,26±0,15 ^b	0,88±0,21 ^b
	5	0,00	1,34±0,17 ^c	1,68±0,20 ^c	1,73±0,77 ^b
	6	0,00	0,63±0,12 ^d	0,77±0,21 ^{ab}	3,16±0,23 ^c
	8	0,00	0,02±0,02 ^e	0,65±0,04 ^a	4,58±0,36 ^d

(*) expresado como µmol/g. Letras diferentes en superíndice para cada columna y lote indican diferencias significativas (p<0,05).

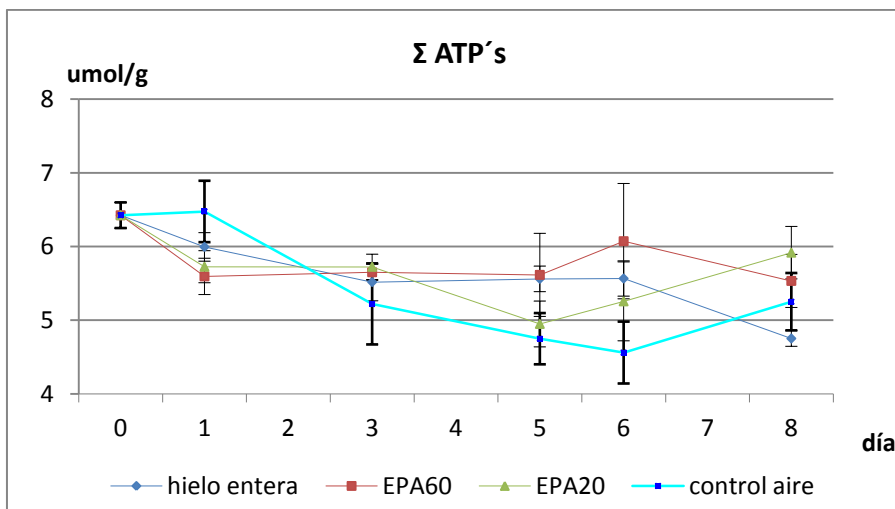


Imagen 127. Sumatorio de los catabolitos del ATP en sardina almacenada en MAP (4°C).

Transformando los valores como la relación de cada catabolito respecto al total, el IMP (Imagen 128) muestra un descenso, más acusado y significativo desde el día 3, para prácticamente desaparecer a día 8. Le sigue el lote en MAP EPA20, y EPA60, que siguen una evolución significativa diferente desde el día 5. Por último, el lote HIELO sobrepasa ligeramente el 50% al cabo del periodo de almacenamiento, y su evolución es la más baja desde el inicio respecto al resto de lotes ($p < 0,05$). El límite de vida útil aplica un valor de 57% para lote en HIELO, 46% para EPA60, 59% para EPA20 y finalmente, 59% para lote AIRE. Estos son, un valor de referencia teniendo en cuenta la relación IMP sugiere valores entre 50 y 60 %.

La HxR (Imagen 129), mantiene un perfil al esperado, esto es, incremento gradual hasta día (en general no significativo, salvo día 1), para descender más rápido en el caso del lote AIRE seguido de EPA20.

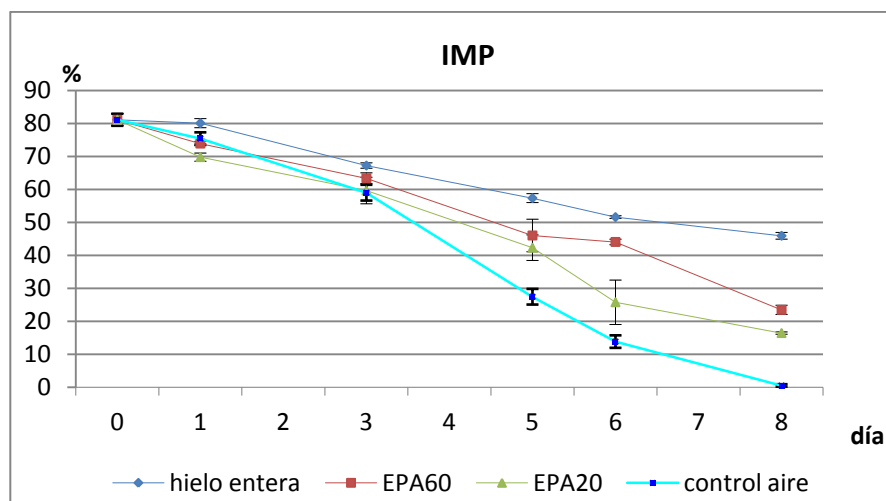


Imagen 128. Evolución del IMP en sardina almacenada en MAP (4°C).

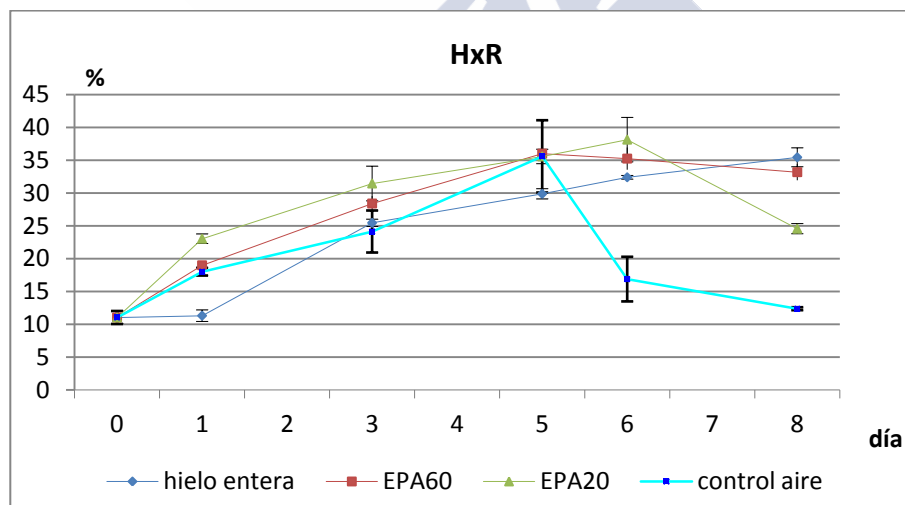


Imagen 129. Evolución de HxR en sardina almacenada en MAP (4°C).

La Hx evoluciona de acuerdo al comportamiento del resto de parámetros (Imagen 130). Así, la mayor tasa de formación de Hx se genera en lote AIRE, seguido del lote EPA20, EPA60 y finalmente

HIELO. En el límite de vida útil, estos mismos lotes alcanzan el Valor H de 17%, 9%, 17% y 7%, respectivamente. Teniendo en cuenta el conjunto de datos relacionados con el análisis sensorial, su correlación es alta ($R^2=0,9024$), lo cual sugiere un valor de referencia de 12-13% Hx.

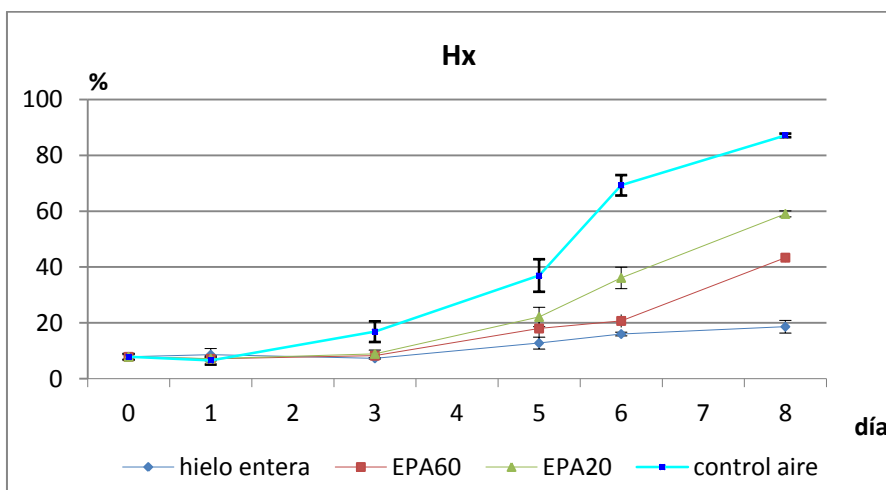


Imagen 130. Evolución de Hx en sardina almacenada en MAP (4°C).

Aplicando el Valor K_i (Imagen 131), salvo el lote en HIELO que asciende más lento en el tiempo respecto al resto de lotes ($p<0,05$), el resto de lotes evoluciona de igual forma hasta el día 3 ($p<0,05$), para aumentar el día 5 en el caso del lote AIRE y alcanzar el 100% al final del estudio. Este aumento sólo puede ser explicado por una actividad bacteriana asociada. Los lotes MAP, siguen distintos patrones de evolución hacia final del estudio a partir del día 6 ($p<0,05$), para alcanzar ambos valores de en torno al 80%.

En el límite de aptitud, el lote HIELO alcanza 43% de valor K_i , que en el caso del lote EPA60 es del 54%, y del 40 y 41% para EPA20 y AIRE, respectivamente. A excepción del lote EPA60, la correlación de cada lote con el análisis sensorial es alto, con $R^2=0,9984$; 0,9765 y 0,9806 para HIELO, EPA20 y AIRE, respectivamente.

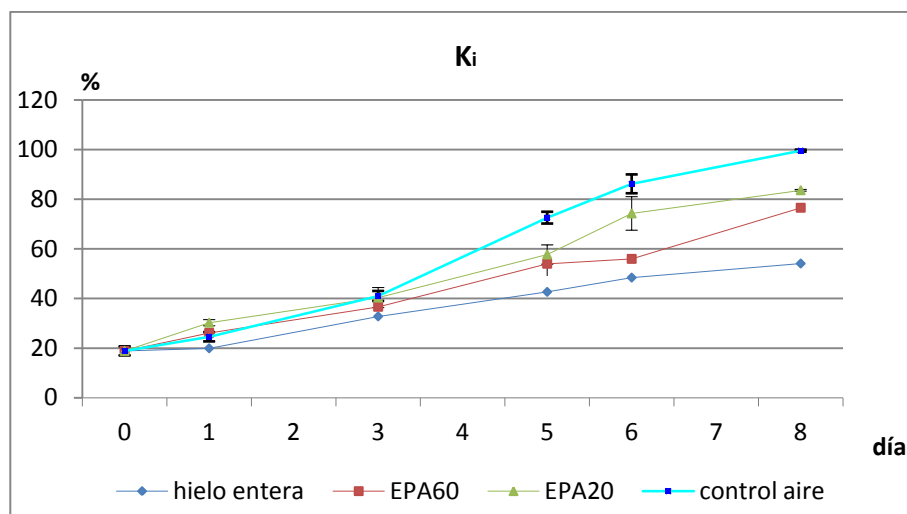


Imagen 131. Evolución del Valor Ki en sardina almacenada en MAP (4°C).

En resumen, el lote control envasado en AIRE a 4°C, es evidente que sufre un deterioro bacteriano importante por la presencia de aminas biógenas como PUT, CAD e HIS, donde además se acentúa la formación de Hx por esta misma vía. Como es de esperar, el límite sensorial lo establecen sensaciones relacionadas con la tasa de grasa, aunque sea baja (índice de TBA) y la formación de aminas volátiles, vía bacteriana. Como es de esperar, el lote almacenado en HIELO, gracias a su menor temperatura (la de fusión del hielo y por el lavado del agua de lixiviación), la generación de productos de alteración bacteriana son los más bajos, a excepción de la formación de compuestos de degradación lipídica (TBA).

EXPERIMENTO E: Se repite la experiencia en Julio 1994 con lote HIELO que corresponde a sardina entera almacenada en condiciones de refrigeración con hielo, con la mezcla de gases EPA60 tronquito envasado con CO₂:N₂ (40:60), y EPA20 tronquito envasado con CO₂:N₂ (80:20), y un último lote de tronquito envasado en AIRE, almacenados en cámara fría, a +1°C.

Los ejemplares (n=15) poseen una talla de 165,1±6,8mm, y un peso de 59,14±9,45 g. La composición básica fue la siguiente:

humedad 62,3 %, proteínas 19,0%, lípidos 16,8% y cenizas 1,3%. En la Tabla 34 se exponen los valores medios del análisis sensorial de un panel de cata de 4 jueces

Tabla 34. Valor Q medio de sardina almacenada en MAP (1°C)

LOTE	Días de almacenamiento							
	0	1	3	4	6	7	8	10
HIELO	3,00	2,54	1,45	1,05	0,35	0,16	0,00	0,00
EPA60	3,00	2,68	1,29	1,48	1,05	0,39	0,56	0,00
EPA20	3,00	1,91	1,02	1,15	0,64	0,34	0,77	0,00
AIRE	3,00	2,32	1,42	0,95	0,80	0,19	0,06	0,00

A la vista de los resultados del análisis sensorial, indican que la sardina almacenada en hielo posee un valor límite de 4 días (HIELO), rechazado por manifiestas sensaciones amoniacales mientras que el lote almacenado en AIRE ronda los 3 días, en este caso por claros indicios de rancidez en olor tanto en fresco como en cocido. Los lotes MAP, el lote con menor tasa de CO₂ es el que alcanza mayor vida útil (6 días) por un sabor astringente y olor “a humedad” en fresco, principalmente, frente al EPA20, con 4 días, que se rechaza principalmente por un olor extraño, agrio en fresco, y sabor ácido en cocido. Al final, el envasado MAP con 40% CO₂ permite alcanzar 3 días más que en condiciones de almacenamiento en aire a +1°C.

El índice de TBA (Imagen 132), y como es de esperar, refleja una evolución significativamente distinta para cada lote ($p < 0,05$). Así, en el lote AIRE, la formación de compuestos de degradación lipídica son más altos en el lote HIELO, esto es, cuando alcanzan en el límite de aptitud entre 8 y 9 mg MDA/kg para ambos lotes. Como ocurrió en otras ocasiones, la formación de MDA en temporadas con sardina más grasa, ocurre rápido y con mayor tasa que cuando la sardina es magra (marzo). Por último, EPA60 asciende a día 4 para mantenerse hasta el final (2-3 mg MDA/kg), mientras que EPA20 no sobrepasa el 1 mg MDA/kg.

La formación de BVT (Imagen 133), con un valor alto inicialmente (16 mg N/100g), se mantiene en todos los lotes, algo más bajo en el lote en HIELO ($p > 0,05$), pero para destacar cada lote de

forma distinta a partir del día 7 y hacia el final del periodo de almacenamiento, destacando por su mayor tasa ($p<0,05$) el grupo constituido por los lotes AIRE seguido del EPA20, con 21,5 mg N/100g, y el grupo de HIELO y EPA60 (17,5 mg N/100g).

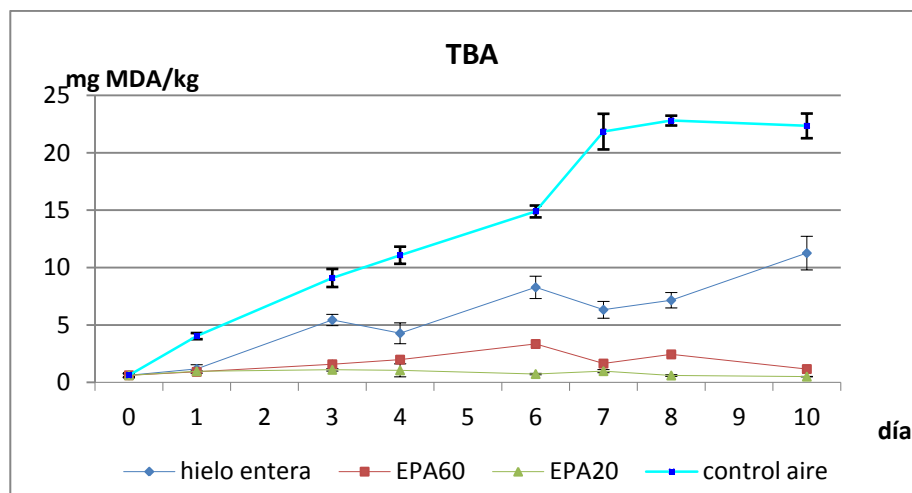


Imagen 132. Evolución de TBA durante el almacenamiento refrigerado en MAP (1°C)

La formación de TMA se refleja en la Imagen 134. Se observa una menor generación de TMA en el lote HIELO ($p<0,05$) respecto al resto de lotes, gracias a la acción de la temperatura del hielo y por el lavado con el agua de lixiviación. En el resto de lotes sube ligeramente hasta la semana ($p>0,05$), para comportarse de diferentes manera según lote, EPA60 muy similar al HIELO, despuntando EPA20 sobre AIRE, en cualquier caso sin sobrepasar los 3 mg N/100g, valor muy bajo para los niveles que se han registrado en otros experimentos en MAP, dada la baja temperatura de almacenamiento.

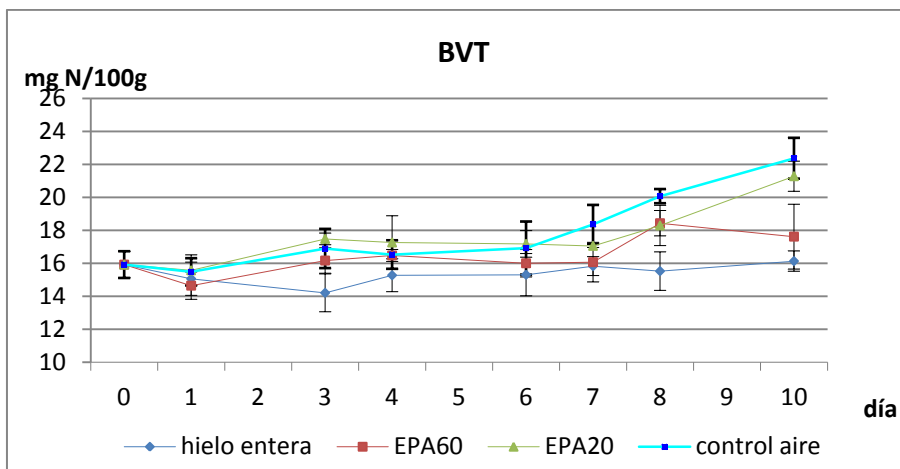


Imagen 133. Formación de BVT durante el almacenamiento refrigerado de sardina (1°C)

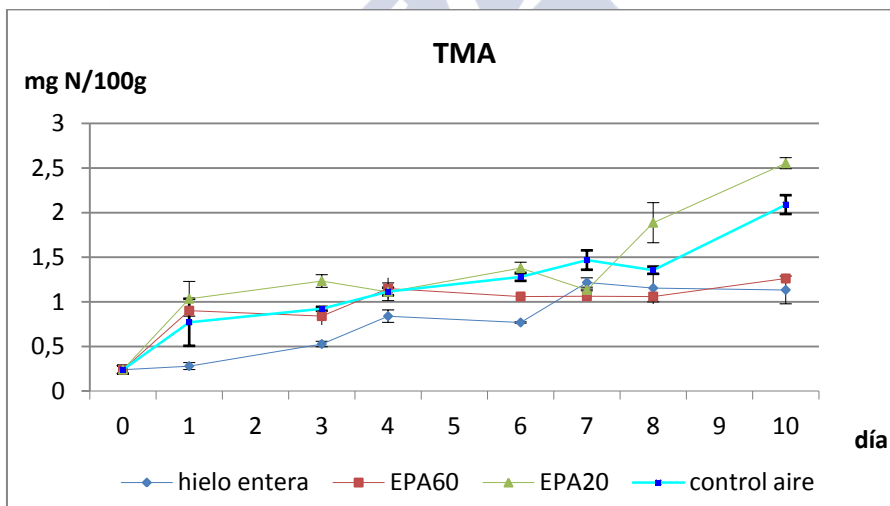


Imagen 134. Formación de TMA durante el almacenamiento refrigerado de sardina (1°C)

Este efecto térmico, también se refleja con menor tasa de formación en aminas biógenas en el periodo de almacenamiento (Tabla 35). Se puede observar que hasta el final del almacenamiento, las aminas dominantes son SPA, con una disminución en su tasa (muy pequeña) desde 9 a 7 ppm en los lotes HIELO, EPA20 y AIRE, mientras que el lote EPA60 se mantiene. La SPN se mantiene constante en todos los lotes y sin diferencias significativas entre ellos, con valores entre 4 y 5 ppm. En cuanto a la PUT, esta se mantiene constante en todos los lotes y sin diferencias significativas entre éstos, a excepción del lote HIELO, que alcanza casi las 2 ppm al final del estudio ($p < 0,05$), posiblemente gracias a la flora bacteriana procedente de las vísceras.

En general, las aminas biógenas características de alteración en sardina a $+1^{\circ}\text{C}$ se genera a bajas tasas, destacando la AGM, con un máximo significativo de 8 ppm en el lote EPA20 a día 10, seguido por lote AIRE con 5,3 ppm y casi 2 ppm en el lote AIRE. La CAD, que es una amina característica a bajas temperaturas, sólo destaca en el lote EPA20 con 2 ppm, con tasas insignificantes en el resto de lotes. La tasa de HIS no es significativa, testimonial, en todos los lotes. Pero en este caso, destaca la formación de TYR, especialmente en el lote EPA60 y AIRE, cuya formación se justificaría a un cambio de la flora bacteriana alterante, bien a causas estacionales o por una supresión de la actividad de otras bacterias que forman CAD o AGM como las características, favoreciendo a aminas generadoras de TYR.

A bajas temperaturas, cercanas a 0°C , la generación de aminas biógenas, y también las volátiles, es muy baja, por lo que como ocurrió en anteriores experimentos a mayor temperatura, éstas no serían indicadoras de alteración, al menos si se contrastan con el análisis sensorial. En este caso, sólo el índice de TBA sería indicador de alteración de la fracción grasa, pero con unos límites mayores en el límite de vida útil en relación con otros experimentos desarrollados.

En la Tabla 36, se exponen los valores medios de los catabolitos del ATP durante la degradación de los diferentes lotes almacenados a $+1^{\circ}\text{C}$).

Tabla 35. Formación de aminas biógenas ($\mu\text{g/g}$) de sardina en MAP a $+1^\circ\text{C}$.

lote	día	PUT	TYR	CAD	HIS	AGM	PHE	SPN	SPA
HIELO	0	0,84 ^a	0,18 ^a	0,64 ^a	0,00 ^a	0,03 ^a	0,00 ^a	4,14 ^a	8,85 ^a
	1	0,84 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	4,86 ^a	10,41 ^a
	3	1,38 ^a	0,00 ^a	0,14 ^a	0,00 ^a	0,16 ^a	0,00 ^a	5,51 ^a	10,04 ^a
	4	1,07 ^a	0,00 ^a	0,20 ^a	0,20 ^a	0,18 ^a	0,64 ^a	4,61 ^a	8,64 ^a
	6	0,98 ^a	0,00 ^a	0,20 ^a	0,27 ^a	0,25 ^a	0,64 ^a	4,61 ^a	8,50 ^a
	7	1,67 ^{ab}	1,45 ^{ab}	1,23 ^b	0,07 ^a	0,88 ^a	0,35 ^a	4,13 ^a	6,29 ^b
	8	1,18 ^{ab}	0,41 ^a	0,12 ^a	0,06 ^a	0,25 ^a	0,27 ^a	4,22 ^a	4,92 ^b
	10	1,68 ^b	1,65 ^b	1,06 ^b	0,02 ^a	1,98 ^b	0,15 ^a	3,60 ^a	6,53 ^b
EPA60	0	0,70 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	4,19 ^a	8,87 ^a
	1	0,64 ^a	0,00 ^a	0,05 ^a	0,06 ^a	0,03 ^a	0,13 ^a	3,02 ^a	6,48 ^a
	3	1,15 ^a	0,14 ^a	0,36 ^a	0,38 ^a	0,07 ^a	0,97 ^a	4,91 ^a	10,54 ^a
	4	1,12 ^a	0,35 ^a	0,60 ^a	0,54 ^a	0,12 ^a	0,98 ^a	5,39 ^a	10,17 ^a
	6	0,60 ^a	1,16 ^{ab}	0,25 ^a	0,12 ^a	0,11 ^a	0,66 ^a	4,99 ^a	10,25 ^a
	7	0,92 ^a	1,37 ^{ab}	0,04 ^a	0,05 ^a	0,06 ^a	0,32 ^a	4,34 ^a	7,85 ^a
	8	0,89 ^a	3,19 ^b	0,06 ^a	0,84 ^a	0,62 ^b	2,45 ^a	4,90 ^a	9,62 ^a
	10	0,76 ^a	3,44 ^b	0,20 ^a	0,17 ^a	0,25 ^{ab}	1,84 ^a	4,26 ^a	8,61 ^a
EPA20	0	0,70 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	4,19 ^a	8,87 ^a
	1	1,11 ^a	0,00 ^a	0,41 ^a	0,07 ^a	0,10 ^a	0,97 ^a	4,91 ^a	10,29 ^a
	3	1,09 ^a	0,00 ^a	0,40 ^a	0,11 ^a	0,00 ^a	0,33 ^a	5,32 ^a	11,18 ^a
	4	1,02 ^a	0,46 ^a	0,78 ^a	0,52 ^a	0,24 ^a	1,05 ^a	4,65 ^a	10,85 ^a
	6	1,07 ^a	1,04 ^a	0,33 ^a	0,30 ^a	0,45 ^a	0,81 ^a	4,91 ^a	8,74 ^a
	7	0,96 ^a	2,01 ^a	0,12 ^a	0,14 ^a	0,23 ^a	0,69 ^a	4,13 ^a	7,82 ^b
	8	0,99 ^a	1,59 ^a	1,42 ^b	1,72 ^b	7,39 ^b	0,67 ^a	4,25 ^a	6,25 ^b
	10	0,95 ^a	1,33 ^a	2,13 ^b	1,02 ^{ab}	8,11 ^b	0,32 ^a	3,91 ^a	8,05 ^{ab}

lote	día	PUT	TYR	CAD	HIS	AGM	PHE	SPN	SPA
AIRE	0	0,70 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	4,19 ^a	8,87 ^a
	1	0,99 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,05 ^a	4,67 ^a	10,26 ^a
	3	1,00 ^a	0,00 ^a	0,17 ^a	0,15 ^a	0,09 ^a	0,24 ^a	5,27 ^a	9,92 ^a
	4	1,38 ^a	0,26 ^a	0,49 ^a	0,31 ^a	0,00 ^a	0,87 ^a	5,41 ^a	10,82 ^a
	6	1,14 ^a	0,00 ^a	0,33 ^a	0,22 ^a	0,00 ^a	0,39 ^a	5,26 ^a	10,27 ^a
	7	1,60 ^a	2,19 ^b	0,26 ^a	0,24 ^a	0,89 ^{ab}	1,84 ^b	5,13 ^a	9,88 ^a
	8	1,02 ^a	4,01 ^c	0,65 ^{ab}	0,24 ^a	3,98 ^b	1,30 ^{ab}	4,70 ^a	8,00 ^b
	10	0,81 ^a	5,81 ^c	1,16 ^b	1,01 ^a	5,31 ^c	0,55 ^a	3,98 ^a	7,12 ^{ab}

Letra diferente en superíndice por lote y columna, indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 36. Formación de catabolitos del ATP ($\mu\text{mol/g}$) en sardinas almacenadas en MAP (1°C).

LOTE	día	AMP	IMP	HxR	Hx
Hielo	0	0,03 \pm 0,04	4,59 \pm 0,24 ^a	0,86 \pm 0,06 ^a	0,20 \pm 0,01 ^a
	1	0,00	4,67 \pm 1,12 ^a	0,87 \pm 0,22 ^a	0,18 \pm 0,04 ^a
	3	0,00	4,93 \pm 0,12 ^a	1,48 \pm 0,02 ^b	0,34 \pm 0,03 ^b
	4	0,00	4,21 \pm 0,46 ^a	1,51 \pm 0,18 ^b	0,43 \pm 0,12 ^b
	6	0,00	3,48 \pm 0,91 ^{ab}	1,45 \pm 0,59 ^{ab}	0,52 \pm 0,12 ^{bc}
	7	0,00	3,71 \pm 0,18 ^b	2,26 \pm 0,11 ^c	0,60 \pm 0,09 ^c
	8	0,00	3,40 \pm 0,21 ^b	2,08 \pm 0,19 ^{bc}	0,83 \pm 0,26 ^c
	10	0,00	2,77 \pm 0,04 ^c	2,40 \pm 0,06 ^c	0,68 \pm 0,14 ^c

LOTE	día	AMP	IMP	HxR	Hx
EPA60	0	0,03±0,04	4,59±0,24 ^a	0,86±0,06 ^a	0,20±0,01 ^a
	1	0,00	4,66±0,25 ^a	1,51±0,11 ^b	0,28±0,02 ^b
	3	0,00	4,41±0,32 ^a	1,66±0,17 ^b	0,40±0,07 ^c
	4	0,00	4,01±0,41 ^{ab}	1,66±0,11 ^b	0,57±0,16 ^c
	6	0,00	4,12±0,32 ^{ab}	1,50±0,20 ^b	0,42±0,07 ^c
	7	0,00	4,60±0,29 ^a	1,52±0,15 ^b	0,45±0,11 ^c
	8	0,00	4,68±0,06 ^a	1,93±0,02 ^c	0,58±0,06 ^{cd}
	10	0,00	3,56±0,36 ^b	1,97±0,36 ^{bc}	0,68±0,08 ^d
EPA20	0	0,03±0,04	4,59±0,24 ^a	0,86±0,06 ^a	0,20±0,01 ^a
	1	0,00	4,94±0,13 ^a	1,55±0,08 ^b	0,41±0,04 ^b
	3	0,00	4,31±0,44 ^a	1,73±0,32 ^b	0,66±0,07 ^c
	4	0,00	4,27±0,09 ^a	1,88±0,22 ^b	0,45±0,09 ^b
	6	0,00	3,81±0,25 ^{ab}	2,11±0,11 ^{bc}	0,67±0,16 ^{bc}
	7	0,00	4,96±0,19 ^a	1,69±0,04 ^b	0,57±0,23 ^{bc}
	8	0,00	4,69±0,30 ^a	1,62±0,10 ^b	0,45±0,13 ^b
	10	0,00	3,62±0,02 ^b	2,63±0,21 ^c	0,86±0,09 ^c
Control AIRE	0	0,03±0,04	4,59±0,24 ^a	0,86±0,06 ^a	0,20±0,01 ^a
	1	0,00	4,71±0,16 ^a	1,55±0,09 ^b	0,34±0,04 ^b
	3	0,00	4,71±0,10 ^a	1,87±0,11 ^c	0,56±0,30 ^{abc}
	4	0,00	3,66±0,13 ^b	1,62±0,10 ^{bc}	0,53±0,14 ^{bc}
	6	0,00	3,76±0,24 ^b	1,73±0,02 ^c	0,62±0,29 ^{bc}
	7	0,00	3,71±0,16 ^b	2,25±0,11 ^d	0,71±0,08 ^c
	8	0,00	3,89±0,20 ^b	2,23±0,32 ^{cd}	0,88±0,24 ^{cd}
	10	0,00	3,93±0,06 ^b	2,52±0,07 ^d	0,89±0,03 ^d

Letra diferente en superíndice por lote y columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En este caso, a pesar de esta baja temperatura, y a lo largo de 10 días de almacenamiento, la degradación del IMP es significativa, y más rápida en los últimos días en el lote HIELO, posiblemente tras la invasión bacteriana procedente de la zona visceral ($p < 0,05$). En el resto de lotes, el descenso es menos acusado, y sin mostrar diferencias entre ellos, a excepción del lote en AIRE, pero muy baja esta diferencia. Como en otras ocasiones, la evolución de la HxR es un balance entre lo generado a expensas del IMP y su degradación a Hx. Respecto a la formación de esta última, su tasa es lenta en 10 días si se compara la evolución con estos mismos lotes a 4°C (experimento D). El sumatorio de todos los catabolitos se refleja en la Imagen 135, pudiendo apreciar que esta tasa se mantiene constante, no hay pérdidas, y a pesar de apreciar diferencias significativas entre los distintos lotes, estas son muy pequeñas; los valores oscilan entre 6 y 7 $\mu\text{mol/g}$.

Siguiendo en la misma línea de evaluar la tasa de formación o relación de cada catabolito con respecto al total de catabolitos, el IMP (Imagen 136) presenta una caída acusada en todos los lotes, pero más lenta en el lote HIELO ($p < 0,05$), hasta el día 6, cuando se observa un comportamiento diferente. En los lotes MAP, parece existir un mantenimiento de los niveles entre el día 4 y 8, para descender hacia el final. A día 6 existe una bajada acusada en EPA20, que podríamos explicar por un acondicionamiento poco apropiado durante el tratamiento de las muestras, ya que la tendencia a posterior no justifica dicho valor para un triplicado. El lote HIELO es el que más sufre la degradación del IMP hacia el final del estudio.

La relación de HxR (Imagen 137) sube lentamente hacia el final del estudio; más rápido en los lotes almacenados a 1°C frente al lote en HIELO (tasa más baja) en los primeros días, para invertirse hacia el final del periodo de almacenamiento, siendo una tasa más elevada en dicho lote en HIELO.

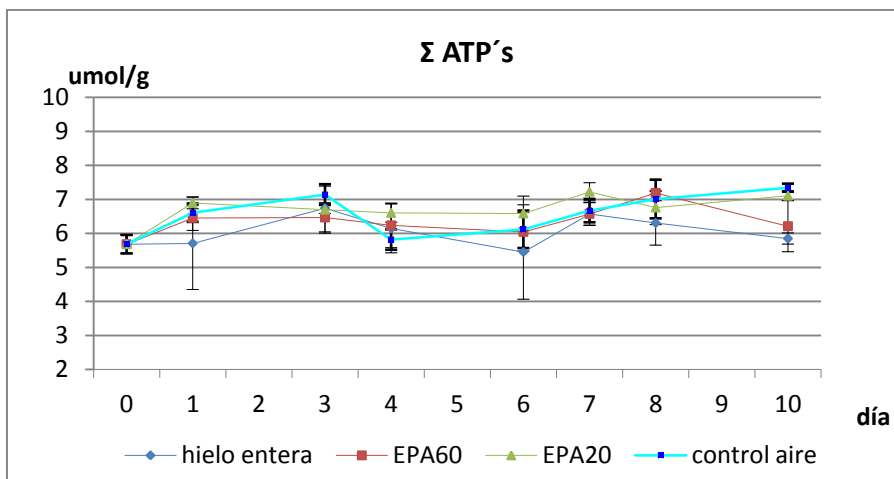


Imagen 135. Sumatorio de los catabolitos del ATP de sardina refrigerada en MAP a 1°C.

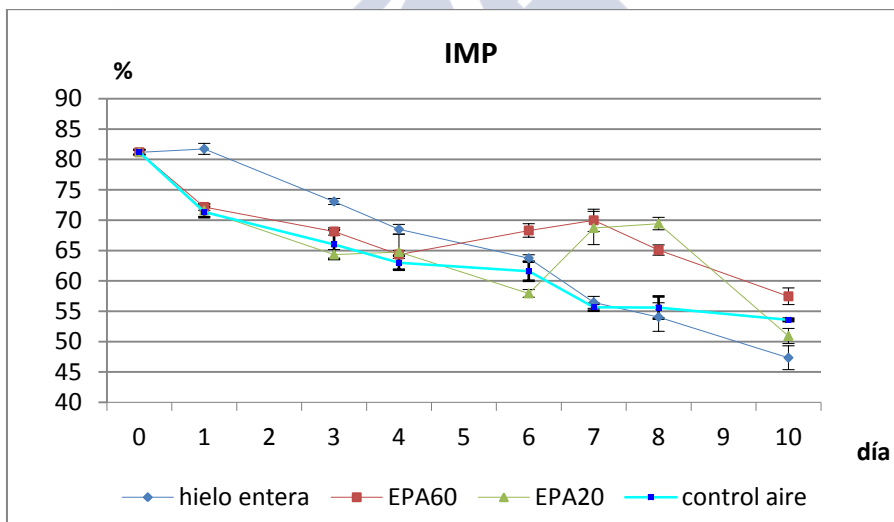


Imagen 136. Evolución de la relación de IMP en sardina refrigerada en MAP a 1°C.

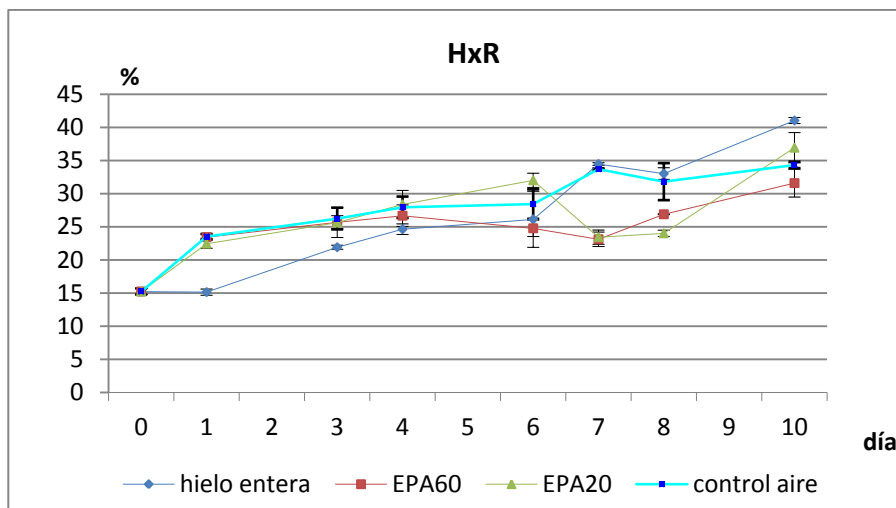


Imagen 137. Evolución de la relación de HxR en sardina refrigerada en MAP a 1°C.

El valor H o relación de Hx (Imagen 138) manifiesta un aumento suave, pero sólo significativo entre días iniciales y los últimos días. En este caso, la formación en 10 días es baja, desde el 4% inicial hasta casi el 12% en todos los casos. En el límite de aptitud, el lote HIELO, AIRE, EPA60 y EPA20 alcanzan el 7, 8, 7 y 10%, respectivamente. Es decir, como en anteriores Experimentos, cuando se alcanza el límite de aptitud, el valor de referencia se halla por debajo del 10% de Hx presente en el músculo.

Observando el Valor K_i (Imagen 139), se observa una tendencia o crecimiento lineal durante su almacenamiento en el caso de los lotes AIRE y HIELO, con un valor de 32% en el límite de aptitud en ambos casos. En el caso de MAP, en ambos lotes alcanza el 25%.

En este Experimento, a 1°C, la tasa de Valor K_i ha sido la más baja con relación a otros experimentos, por la ralentización de la actividad enzimática, pero es obvio que la decisión sensorial es una combinación de factores químicos, donde el peso de la mayor tasa de grasa juega un papel fundamental, primando sobre la posición o peso relativos de otros factores relacionados con la frescura como los catabolitos del ATP o aminas. En general, el lote mejor valorado,

teniendo en cuenta su Valor Q, ha sido el lote EPA60, esto es, con menor tasa de CO₂.

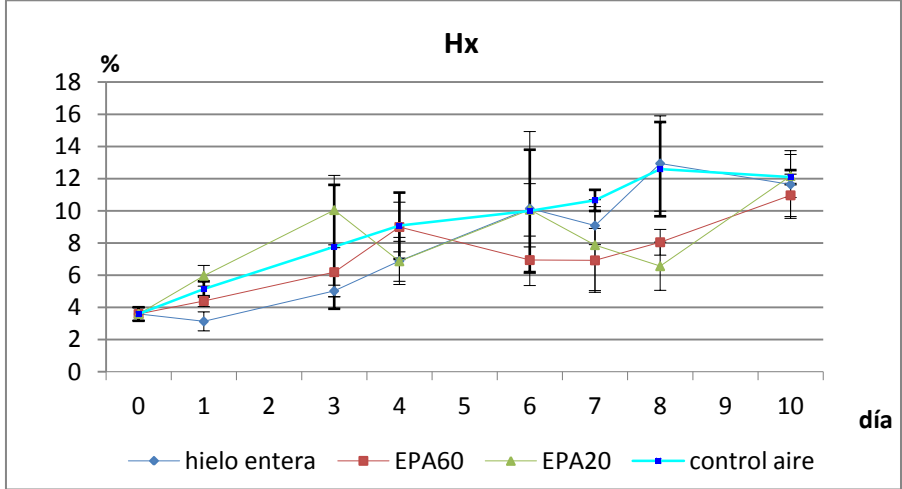


Imagen 138. Evolución de la relación de Hx en sardina refrigerada en MAP a 1°C.

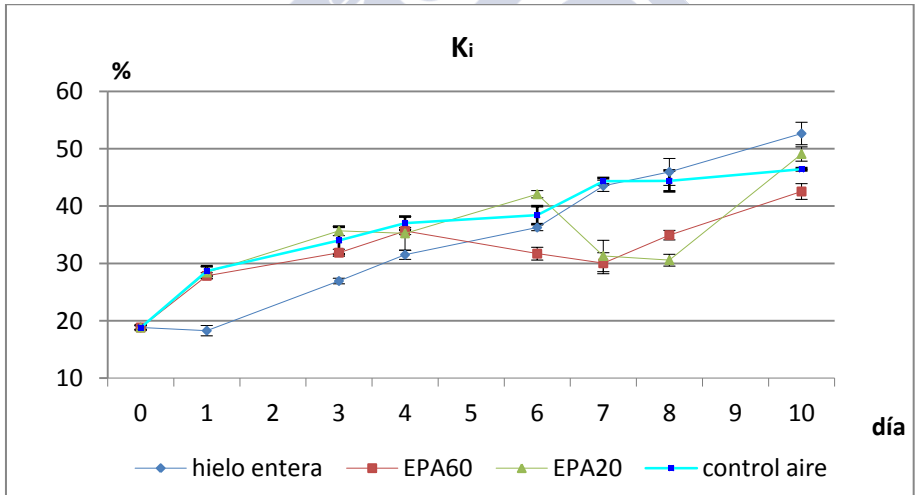


Imagen 139. Evolución del Valor Ki en sardina refrigerada en MAP a 1°C.

El pescado almacenado en hielo (~0,5°C) mantiene unas cualidades sensoriales adecuadas en torno a 4-5 días, dependiendo de

la tasa de grasa y de la posible carga bacteriana estacional (no evaluada). Una atmósfera protectora con tasa media de CO₂ (~50%), desde un punto de vista físico-químico y en comparación con atmósferas con tasas más altas, o con tasas leves de O₂ en su mezcla, preservan mejor el pescado frente a una atmósfera de aire en igualdad de condiciones térmicas, pero es importante el mantener unas condiciones de frío lo más bajas posibles. La formación de determinadas aminas biógenas en estas condiciones sugieren una actividad bacteriana que debe ser evaluada, y al menos poder controlar la presencia de *Clostridium botulinum* como organismo de riesgo. Pero no hay lugar a dudas, que en estas condiciones, el minimizar la autooxidación lipídica es el factor más importante por las respuestas en el análisis sensorial.

En base a los resultados globales obtenidos en este trabajo, se sugiere el uso del Valor H como indicador de frescura, donde valores entre 10-15 % indican el límite de aptitud. El valor K_i, también es interesante con un indicador de frescura, donde valores de entre 40 y 55% indicarían un producto alterado. Al igual que la presencia mayoritaria de cadaverina y agmatina, donde niveles de 8-10 ppm serían indicadores de alteración bacteriana en refrigeración. Niveles detectables de histamina y tiramina por encima de los 5-10 ppm, indican unas condiciones de rotura de cadena de frío o unas condiciones de almacenamiento refrigerado con tiempo excesivo. La espermidina y espermina no son adecuadas para parámetros de control por su estabilidad en general, con alguna excepción cuando el pescado se almacena en hielo, donde aumenta ligeramente (por ¿microorganismo aerobio??).

La mayor parte de los volátiles detectados en el análisis sensorial de pescado se asocian a la generación de aminas (TMA, NH₃, principalmente), especialmente en condiciones normales de refrigeración (hielo, cámara), que se generan por procesos autolíticos tras la muerte, pero se incrementan con la invasión bacteriana, y esta flora dependerá de la estación y zona de pesca, que condicionarán su posterior almacenamiento, sobre todo la piel y vísceras (Gram y Huss, 1998). En aguas templadas como la Atlántica Europea, bajo refrigeración dominan especies de Enterobacterias pricrófilas,

Pseudomonas fragi, acidolácticas, *Aeromonas spp* y *Photobacterium phosphoreum*, mientras que en condiciones de MAP o vacío, las notas a aminas y sulfuradas en el análisis sensorial, son aportadas por especies de *Pseudomonas*, *Shewanella putrefaciens* (Chinivasagam y col., 1998; Gram y col., 2002; Josephson, 2017), pero también se detectan tasas elevadas de alcoholes, cetonas, aldehídos y ésteres (Jørgensen y col., 2001; Wang y col., 2017), tal y como Dulfos y col. (2006) corroboraron durante el almacenamiento de caballa, bacalao y merlán tras 10 días de almacenamiento a 4°C.

Böhme y col. (2010), además de los mencionados microorganismos, también destacan la presencia de *Proteus*, *Serratia* y *Vibrio*. En el caso de langostinos *Vannamei* cocidos y en MAP, destacan como microorganismos alterantes *Shewanella* y *Carnobacterium* (Macé y col., 2014). En general, estos microorganismos son muy similares a los alterantes en otros productos de naturaleza muscular como la carne de vertebrados terrestres, con sus correspondientes productos de metabolización: alcoholes, aldehídos, ácidos grasos volátiles, cetonas y compuestos sulfurados, destacando el caso de *Pseudomonas fluorescens*, *P. fragi*, *Brochothrix thermosphacta*, *Aeromonas*, *Alteromonas* y *Lactobacillus* por su capacidad de desarrollarse indistintamente en condiciones aerobias, MAP y vacío (Casaburi y col., 2015), amén de la capacidad de éstas para formar aminas biógenas en función de los precursores existentes en la matriz proteica (Brink y col., 1990; Chinivasagam y col., 1998; Bitá y col., 2015; Du y col., 2017).

Los estudios de almacenamiento o alteración refrigerada según la especie, de acuerdo a la tasa de grasa, son puntuales, por lo que los resultados suelen ser dispares en su interpretación. Así, para *Sardinella sagax* (Pacheco-Aguilar, y col., 2000) compara su almacenamiento con hielo a 0°C con materia prima capturada en invierno (8,4% grasa) y primavera (1,1%). El pH baja de 7,2 *in vivo* hasta 5,7 en invierno y 5,9 en primavera, observando un incremento durante 15 días y significativamente mayor en la sardina de primavera, con menos grasa, sin llegar a superar pH 6,1, muy similar al mostrado por la especie *Sardinella aurita* durante 20 días a 4°C (5,8 a 6,3), asociado inicialmente a la producción de 36 µmol/g de ácido

láctico independientemente de su evisceración o no, o de su periodo de captura, verano y otoño (Bottini y col., 2001). Pacheco-Aguilar y col. (2000) señalan que la sardina de invierno posee una actividad proteolítica muscular muy superior a la de primavera, que se acelera con el transcurso del almacenamiento, sin embargo, no tiene reflejo en la formación de nitrógeno no proteico o aumento de pH.

La producción de TMA es mayor en invierno, cuyo valor de partida es de 0,9 frente a los 0,3 de primavera, pero no superando más allá de 2 mg N/100g en el límite de aptitud, aunque en la bibliografía se considera que valores de 5-10 mg son suficientes para rechazar el pescado y son indicativos de olores asociados a esta amina volátil (Sikorski y col, 1990), pero esta diferencia inicial entre periodos se achaca a una mala manipulación postcaptura en invierno, no siendo considerado un buen parámetro de deterioro. No observa diferencias significativas en la evolución del valor K, alcanzando un 50% al final del estudio, así como valores bajos de histamina (16 ppm) a 0°C.

Las BVT y TMA, dada la variabilidad mostrada en los distintos ensayos realizados, no son adecuados parámetros de frescura; si bien, valores de 20 mg N/100g serían indicadores de alteración para *Sardina pilchardus* refrigerada. La TBA tampoco es un parámetro de frescura adecuado, ya que depende de la tasa inicial de grasa y de las condiciones de almacenamiento refrigerado en aerobiosis. Valores de TBA de entre 2-3 mg MDA/kg, indican una patente actividad oxidativa que se manifiesta en sensaciones de rancidez. En estas condiciones, las muestras evisceradas en MAP aumentan su vida útil respecto a las evisceradas en aire de 2 días. Con el transcurso de los días, la muestra no eviscerada (hielo) el color del músculo pasa de un tono anaranjado-rosado a un tono rojizo, mientras que las evisceradas en aire pasan a un tono cremoso con tonos amarillos en las zonas de acumulación grasa (zona dorsal, superficie-bajo piel, y zona abdominal) y las evisceradas en MAP pasan a un tono crema pálido ceroso. Es evidente la ventaja que posee la evisceración en base a los datos obtenidos, respecto a la producción de compuestos nitrogenados, la mayor parte como resultado de la degradación bacteriana (NH₃, TMA, aminas biógenas). La eliminación de la zona cefálica y visceral reduce considerablemente la población microbiana que altera el

pescado, tal como se manifiesta en las formación de aminas biógenas y volátiles.

De acuerdo con la legislación europea, BVT es una herramienta en la que apoyarse ante dudas en el análisis sensorial, estableciendo unos límites para ciertos grupos de peces, pero entre los que no se encuentra la sardina. El límite más bajo se halla en 20 mg N/100 g (UE; 2008). Gulsun y col (2009) proponen rangos de calidad para definir la frescura basados en BVT, “Excelente” hasta 25 mg N/100g, “buena” entre 26 y 30 mg N/100 g, y el límite en 30 mg N/100g para el salmonete *Mullus barbatus*. Otros autores proponen BVT como un simple indicador de alteración pero no de frescura (Reilly y col., 1985; Ruíz-Capillas y Horner, 1999; Ruíz-Capillas y col., 2001). Por los niveles detectados en mercados (con temperaturas en superficie del pescado de +10°C), en el caso de sardina, el 12% de muestras se rechazarían (detectándose hasta 82 mg N/100 g), por lo que BVT no se puede usar como indicador de frescura (Jinadasa, 2014).

Por el contrario, la evisceración tiene el problema de la aceleración de los fenómenos de autooxidación lipídica, ya que se aumenta la superficie de contacto con el oxígeno ambiente a través de las paredes abdominales, donde los valores de TBA son mayores que en un lote no eviscerado, incrementándose gradualmente con el tiempo de almacenamiento. Los ejemplares eviscerados bajo MAP muestran valores constantes de TBA, gracias a la ausencia de O₂, al igual que ocurre con *Sardinops melanostictus* (Fujii, 1989), si bien, otros autores (Stammen y col., 1990) para caballa, opinan que aunque el CO₂ no promueva la autooxidación, éste no impide que el MDA se siga produciendo, pero más lentamente. Puede ocurrir que la tasa de formación en este caso sea más lenta o igual a la fijación del MDA producido con radicales proteicos y/o aminoácidos (Undeland y col., 1999; Karlsdottir y col, 2014). De cualquier modo, la sardina del estudio no presenta indicios de rancidez bajo estas condiciones de almacenamiento, si no ácidos, a SH₂ probablemente por el desarrollo de *Pseudomonas spp* y *Lactobacillus spp* (Chinivasagam y col., 1998; Gram y col., 2002; Casaburi y col., 2015; Josephson, 2017).

Tras la lipólisis enzimática, el proceso de oxidación de ácidos grasos responde en parte a un mecanismo no enzimático, donde el

hierro (Fe^{2+}) juega un papel importante, demostrando a partir de ferritina en músculo de vacuno (Decker y Welch, 1990), o de la mioglobina en caballa, manifestándose en cambios de color del músculo, mucho más evidente en el músculo rojo u oscuro, donde la tasa de lípidos es mayor que en el músculo blanco (Decker y Hultin, 1990a; Decker y Hultin, 1990b). Y asociado también a cambios en el sabor en los primeros días de almacenamiento (Sohn y col., 2005), dependiente de la especie y tipo de músculo (Sohn y col., 2005; Chaijan y col., 2005).

En sardina, el nivel de oxidación vendría asociado a la época de captura (mayor o menor tasa de grasa bajo la piel) y por el aporte de la fracción lipídica del tipo de músculo rojo, tal y como se ha descrito para *Sardinella gibbosa* (Chaijan y col., 2006) o para *Clupea harengus* (Undeland y col., 1998; Undeland y col., 1999), donde la zona con la cinética de oxidación de los lípidos, de mayor a menor actividad es: la piel, músculo rojo y músculo blanco. Los diversos parámetros químicos evaluadores de esta oxidación así lo indican, amén de que el pescado sea eviscerado, que en el caso de *Sardina pilchardus* aumentaría la exposición al oxígeno en la zona subperitoneal del músculo ventral (Erkan y Ozden, 2008).

En general, una atmósfera con niveles medios de CO_2 y ausencia de oxígeno aumentan el periodo de comercialización de las especies acuícolas. En este sentido, con el fin de facilitar la preparación culinaria por parte del consumidor, son varios los autores que sugieren esta técnica de MAP como una medida económica y sencilla de preservar la vida útil del pescado. En el caso de especies delicadas como las de carne roja, una atmósfera de 60:40 ($\text{CO}_2:\text{N}_2$) incrementa hasta 21 días las rodajas de *Scomberomorus commerson* a $0/+2^\circ\text{C}$ (frente a los 12 días en hielo), cuyos valores de TMA, BVT y microbiológicos son significativamente inferiores al término de su vida útil; señalar que esta especie la consideran formadora de hipoxantina pues rápidamente alcanza un 95% del valor K, no validando este parámetro como índice de calidad para esta especie (Yesudhasan y col., 2009), o como en el caso de tilapia de cultivo (Cyprian y col., 2013), a temperaturas en torno a 0°C , incrementa su vida útil hasta los 23 días (en base a las cualidades sensoriales, aunque

a los 27 días su flora bacteriana en general se halla por debajo de los 10^4 ufc/g) mientras que el lote control halla su límite de aptitud a los 13-15 días, cuando aerobios y *Pseudomonas* superan los 10^7 ufc/g. *Brochothrix thermosphacta* y *Lactobacillus* se desarrollan en ambos ambientes, aunque su crecimiento es más lento con MAP (donde alcanzan al final del estudio en torno a 10^4 y 10^5 ufc/g, respectivamente).

Los resultados aportados por la bibliografía respecto al uso de MAP son amplios, centrándose principalmente en especies de interés comercial, habitualmente filetes, como en el caso de salmónidos, bacalao, eglefino. Así, en *Salmo trutta*, ensayos con un 40% CO_2 (4°C), frente a almacenamiento en aire y vacío, las BVT exceden de los 30 mg N/100g tras 12, 8 y 10 días, respectivamente, coincidiendo con su vida útil, al igual que los niveles microbiológicos. Mientras que la TBA varía en todos los lotes pero sin sobrepasar los 0,55 mg MDA/kg, con un contenido lipídico bajo, de 1,3% (Karakaya y Duman, 2016). En el caso de dorada, se propone indistintamente el uso de vacío o MAP (40% CO_2 /30% O_2) para preservar *Sparus aurata*, donde los valores químicos (BVT, TMA y TBA) y la microbiología son menores que lote control a 3°C, pero en términos de uso de TBA, el vacío ofrece mejores resultados (Garrido y col, 2016).

En el caso de pescado tratado previamente por sistemas de marinado (acidificación) o salado ligero en *Scomber scombrus*, envasado en MAP (40% CO_2) y vacío hasta 50 días a 4°C, la tasa más alta de BVT se registró en la caballa salada almacenada bajo VP, que actúa como prooxidante, mientras que la BVT-N más baja en la caballa marinada se almacenó en condiciones de MAP. La formación de TBA aumentó con el tiempo de almacenamiento y fue la más baja en la caballa marinada almacenada en MAP. La concentración de histamina aumentó durante el almacenamiento y su nivel alcanzó más de 100 ppm para la caballa salada almacenada en condiciones de vacío. La caballa marinada envasada en MAP tuvo una vida útil prolongada a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ en comparación con la empacada en vacío según el análisis fisicoquímico (Ivanović y col., 2016).

Hansen y col. (2015) antes de envasar en MAP, verifican la importancia del uso previo de cajas con distintos materiales para

transporte de bacalao, desde su descarga hasta la zona de procesado, confirmando que el uso de cartón corrugado es más efectivo en el transporte, al bajar más rápido la temperatura del pescado que el transportado en cajas de PP y EPS, sin diferencias aparentes en el análisis sensorial y microbiológico; tras envasar en MAP y hasta el final del estudio de vida útil, reseñan la importancia de los siguientes géneros bacterianos: *Psychrobacter*, *Shewanella*, *Carnobacterium*, *Pseudomonas* y/o *Acinetobacter*. Por otro lado, con *Thunnus albacores* tras envasar en hielo (13 días de vida útil con más de 10^6 ufc), vacío y MAP (70% CO₂), a 4 y 8°C, *Brochothrix thermosphacta* y *Pseudomonas spp* dominan en hielo, *Brochothrix thermosphacta*, bacterias acidolácticas y *Enterobacterias* dominan en vacío y en MAP sólo *Brochothrix thermosphacta*, y como es de suponer, mayor tasa a 8°C. BVT aumentan por igual en los 3 lotes, pero se observa un curioso fenómeno: la HIS aumenta hasta 8 días, para descender hasta final del ensayo, que los autores achacan a una bacteria degradada o metaboliza la HIS (Silbade y col., 2016).

Respecto a la formación de aminos biógenos durante el almacenamiento refrigerado, y dentro de los rangos de aptitud sensorial, destaca la producción de CAD como amina predominante (en todos los lotes), que no sobrepasa las 10 ppm, con claros signos de alteración. Destaca a continuación la HIS, que aparece al 2º día en las no evisceradas; en las muestras evisceradas aparecen al 6º día, cuando las muestras están muy alteradas. Además, bien refrigerada o en hielo, el límite de aptitud sensorial propuesto por Ababouch y col. (1996) y El Marrakchi y col (1990) es muy superior a los resultados de esta tesis, basados en aspectos externos en crudo, alcanzando 216 y <10 ppm para Cadaverina e Histamina, respectivamente. Pons y col. (2005), para boqueron a 6-8°C alcanza cerca de 100 ppm al 5º día y sobrepasando dicha cifra al 4º día para las evisceradas. Como se observa, las referencias son muy variadas con condiciones diferentes o semejantes, por tanto, la utilización de la Histamina como índice químico de descomposición no siempre es útil, considerando además que la población bacteriana varía estacionalmente, y por consiguiente variar también su concentración.

En cualquier caso, los peces pelágicos con gran cantidad de músculo rojo poseen gran cantidad de aminoácidos libres (Guizani y col., 2014; Digre y col., 2015), precursores de dichas aminos, que se incrementan durante el almacenamiento y a veces otras aminos pueden adquirir mayor importancia, bien a escala individual o en conjunto, cuya tasa puede interaccionar con enzimas digestivas que degradan la histamina, facilitando así la difusión de esta última al organismo con los consiguientes problemas toxicológicos (Clifford y col., 1989). Por ello se adapta la utilización del Índice Karmas y Mietz (Veciana y col., 1997a), como la suma de $(\text{PUT} + \text{CAD} + \text{HIS}) / (1 + \text{SPN} + \text{SPA})$, considerando a las 3 primeras como las más destacables durante la alteración del pescado. O bien, emplear únicamente la cadaverina como parámetro de control, que será diferente según la especie y temperatura de almacenamiento. En nuestro caso, la sardina en un estado de frescura aceptable no supera las 10 ppm de CAD, tal como propone el grupo de Yamanaka para algunas especies (Yamanaka y col., 1986; Yamanaka y col., 1989; Yamanaka y Matsumoto, 1989).

Putrescina, espermidina y espermina ya las contienen “*in vivo*” algunas especies (Yamanaka y Matsumoto, 1989; Rodríguez y col., 1999), siendo más abundante la espermina como en nuestro caso, y que prácticamente permanecen constante a lo largo del almacenamiento, si bien, López-Gámez y col. (1995) observan un aumento de espermidina al final del estudio, mientras que Mietz y Karmas (1989) y Yamanaka y col. (1986) indican su desaparición al final de este estudio, o alguna como la espermina, simplemente no las detectan, si bien pensamos sea un problema de metodología. La putrescina, que ya se haya en baja concentración *in vivo*, aumenta ligeramente respecto a otras aminos (CAD, HIS) en las primeras etapas de almacenamiento refrigerado, aunque el MAP en refrigeración parece inhibir o demorar esta producción (microorganismos con actividad decarboxilasa), así como tasas superiores al 4% de NaCl (Yamanaka y col., 1985; Veciana y col., 1989).

Ozogul y Ozogul (2005) estudian la formación de aminos biógenas a partir de bacterias dominantes en arenque fresco (*Clupea harengus*). Las muestras se dividen en 4 lotes: 1) con hielo, 2) a 2°C,

3) a vacío y 4) con CO₂:N₂ (60:40), todos bajo refrigeración y hasta su periodo de rechazo. En estas condiciones, la flora dominante son por orden decreciente en arenque refrigerado *Pseudomonas*, *Vibrio*, Gram+, *Klebsiella*, *Proteus* y *Hafnia*. En Atmosfera controlada, vacío y gases, *Vibrio*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, Gram+, y *Pseudomonas*, desaparecen *Proteus*, *Klebsiella* y *Hafnia*. Las colonias aisladas se siembran en medios ricos en Histidina, Lisina y Ornitina. El mayor productor de histamina es *Klebsiella oxytoca*, seguido de *Hafnia* (en torno 300 ppm), y *Pseudomonas fluorescens* (10 ppm).

Con lisina, el mayor productor de cadaverina es *Klebsiella oxytoca*, *Hafnia* (entre 200 y 300 ppm). Seguido de *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Proteus* (40-70 ppm). Además también producen Agmatina: *Klebsiella*, *Proteus*, *Vibrio*, *Moraxella* y *Acinetobacter* (10-20 ppm).

Con ornitina, la producción de putrescina mayor corresponde a *Klebsiella*, *Hafnia* y *Vibrio* (100-250 ppm), seguido de *Pseudomonas* (30 ppm). Además, *Proteus* y *Klebsiella* también generan Spermina e Histamina (15-30 ppm) a partir de ornitina. El MAP previene del desarrollo de *Pseudomonas* y Enterobacterias, pero no así respecto a *Vibrio*, *Moraxella*, *Klebsiella* y *Hafnia*, con capacidad para generar HIS, LYS y PUT.

Pons y col (2005) aíslan 140 colonias a partir de anchoa refrigerada durante 23 días en hielo y en aire. Predominan Enterobacterias (37), *Pseudomonas* (23), Cocos Gram+ (49), acidolácticas (27) y enterococos (4). PUT y CAD son generadas por *Enterobacter*, PUT por *Pseudomonas* durante las primeras semanas, mientras que las bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus* y *Lactococcus*) generan TYR, especialmente en los últimos periodos de deterioro. Estos organismos estudiados no tienen capacidad para formar HIS u otras aminas que no sean las indicadas. La formación de aminas depende de la disponibilidad del precursor, flora presente, pH, actividad de agua y temperatura, que condicionan la actividad acidodecarboxilasa de los microorganismos. En productos cárnicos fermentados (chorizo) envasados en MAP, la TYR es predominante precisamente por la presencia de bacterias acidolácticas, mientras que

la CAD predomina en los productos cocidos como jamón (Ruíz y Jiménez, 2004).

Durante el estudio de alteración de diversas especies de pescado atlánticas tropicales, tanto magras (merluza, corvina) como grasas (atún, bonito, sardina), la HIS es generada principalmente por especies de *Proteus*, y entre ellas destaca *P. morganii*, seguidas por otras bacterias que pueden producir además otras aminas, pero en el caso de HIS serían especies que se localizan principalmente en las vísceras, *Aeromonas* y *Acinetobacter*, mientras que especies de la piel como *Pseudomonas*, *Klebsiella* o *Enterobacter*, la cantidad de HIS formada es muy baja comparada con otras aminas como CAD, y todo ello con su óptimo térmico a 25°C (Leitao y col., 1983).

Sin embargo, *Morganella morganii* y *Klebsiella oxytoca* son otros clásicos microorganismos que se implican en intoxicaciones de pescado por HIS. Veciana y col (2004) estudian la formación de aminas de estas bacterias tanto *in vitro* como en muestras reales de atún, a temperaturas de 8 y 20°C. Las aminas predominantes son CAD e HIS, donde su generación es por ambas bacterias. *Klebsiella* forma CAD a cualquier temperatura, pero HIS sólo a 20°C; pero *Morganella* forma principalmente HIS a temperatura alta en muestras inoculadas. Todo ello indica que la formación de HIS por estas bacterias sólo es posible en condiciones de almacenamiento de pescado a temperaturas altas (20°C).

Ozogul y col. (2002) comparan la formación de aminas entre arenque (eviscerado) en cajas a 2°C frente a MAP (60:40; CO₂:N₂) a 2°C. La principal amina generada hasta 16 días es HIS seguida por CAD y PUT en aire (329, 396 y 74 ppm, respectivamente). En MAP predomina HIS, seguida de CAD y AGM (197, 136 y 21 ppm, respectivamente), es decir, sigue el mismo patrón de formación que en aire pero con una producción menor, lo cual indica que el CO₂ inhibe la actividad decarboxilasa de las bacterias. Las diferencias significativas se aprecian a partir del 6º día para la histamina, superando el límite establecido por la UE (100 ppm) a partir del 12º día. Similar fenómeno ocurre con PUT y CAD, que se incrementan más rápido en aire, aminas que pueden potenciar la toxicidad de la HIS (Taylor y Summer, 1986; Stratton y col., 1991). No detecta TRP

ni β -feniletilamina, y la formación de AGM asciende en la primera semana para después mantenerse (50 ppm en aire y 20 ppm en MAP), al igual que en el caso de espermidina y espermina (<5 ppm en ambos casos, y sin mostrar diferencias entre lotes).

En el caso de salmónidos bajo refrigeración y vacío, la amina principal generada durante el almacenamiento es Cadaverina, seguida de Putrescina, con ausencia de histamina (Yamanaka y col., 1989; Rodríguez y col., 1999), mientras que en especies marinas pelágicas (caballa, sardina), de carne roja, la principal amina generada en refrigeración es Histamina, seguida de cerca por Cadaverina y Putrescina (Yamanaka y col., 1986), dado que presentan una mayor tasa del aminoácido histidina libre como en túnidos (Pérez-Martin, 1988; Emborg y col, 2005) o sardina (Shirai y col., 2002). Por otro lado, una flora bacteriana con una mayor actividad histidin decarboxilasa (Edmunds y Eitenmiller, 1975), justificaría la hegemonía de la histamina durante el deterioro frente a otras aminas biógenas, cuya tasa se incrementa con la temperatura de almacenamiento, aunque otros autores han encontrado durante el deterioro del capelín bajo refrigeración, *Mallotus villosus*, tasas de histidina similares a las de lisina al tratar el pescado con antibióticos. De hecho, ante la ausencia de éstos, al cabo de 7 días predomina cadaverina con 31,8 mmol/g, frente a la histamina 5 mmol/g (Aksnes y Brekken, 1988). Shirai y col. (2002) demuestran que para el caso de *Sardinops melanostictus* fresca, la histidina libre representa el 80% de los aminoácidos libres del músculo blanco, donde se localiza principalmente, e indican que existe una diferencia estacional, con mayor cantidad de histidina entre los meses de verano e invierno, periodo de menor actividad de la especie, descendiendo a la mitad en los meses centrales de primavera, y que corresponde con el mayor contenido lipídico. La TMA se incrementa el doble en aire respecto a MAP al final del estudio (32 mg y 17 mg TMA/100g, respectivamente). Todo ello se traduce sensorialmente en una vida útil de 10 días para MAP y de 4 días en aire a 2°C. Esto es, en MAP, HIS supera 80 ppm, mientras que en ambos casos, en el límite de aptitud, la TMA ronda los 15 mg/100g, datos similares a los aportados por Dalgaard y col (1993) para bacalao (*Gadus morhua*).

Es evidente que en igualdad de condiciones de almacenamiento refrigerado, el uso de vacío o MAP aumentan la conservación del pescado. Con el fin de reducir o minimizar la flora bacteriana, las últimas tendencias son aplicar sustancias naturales combinadas con MAP o vacío, como es la aplicación de aceite esencial de limón a *Sardina pilchardus* salada; con una emulsión entre 0,3 a 1% (v/v), se reduce al final del almacenamiento la flora de *Staphylococcus*, bacterias acidolácticas y Enterobacterias, menor producción de HIS y se mejoran las cualidades sensoriales (Alfonzo y col., 2017); al igual que el uso de nisina, que combinada con 19 o 38% CO₂ (más 11% O₂) reduce la formación de BVT, bacterias aerobias y psicrófilas en los 10 días de vida útil, pero no afecta a las bacterias acidolácticas que son las predominantes (Han y col., 2016). Y así con tantos productos químicos, sean ácidos orgánicos o sales de éstos, como benzoato sódico con vacío (Kedar y col, 2016) o aceites esenciales varios (Hassoun y Coban, 2017).

Pero tanta o más importancia adquiere la temperatura con la que se combinen estas MAP, sobre todo para evitar la formación de histamina en *Thunnus albacares*, que será menor a temperaturas bajas como 0-3°C, sin superar las 30 ppm a los 15 días de almacenamiento, pero rondando los 90 ppm en este periodo a 7°C (Jinadasa y col., 2015).

Con temperaturas bajas (hielo y 2°C) en *Clupea harengus*, la formación de aminas biógenas es menor, destacando CAD e HIS en torno a las 30 ppm tras 15 días en aire, reduciéndose ligeramente si se envasa en MAP (60% CO₂) y vacío (Ozogul y col., 2002). Esta formación depende además del momento de la captura y el contenido estomacal en el momento de la muerte, donde la flora bacteriana varía según época del año (Rodríguez y col., 1999). En estas vísceras se localiza el psicrófilo *Photobacterium phosphoreum*, un responsable más del deterioro de diversos filetes de pescado del mercado en MAP (con MAP entre 50 y 60% CO₂), proponiendo un simple método luminiscente para esta bacteria sobre el propio filete, como indicador del grado de deterioro (Dalgaard y col., 1997). Un proceso previo de congelación de filetes de bacalao seguido de descongelación y almacenamiento en MAP (a 2°C), mejora la distribución estándar en

los canales comerciales, con una ganancia de 20 días de vida útil frente al control (12 días en hielo), ya que *Photobacterium phosphoreum* es destruida por la congelación (Guldager y col., 1998).

También el tipo de film empleado juega un papel fundamental en la vida útil y salubridad del alimento, como el observado con *Rutilus frisii* ahumado con un 70% CO₂, donde *Clostridium botulinum* presenta menor desarrollo hasta 6 meses, con un film de 4 capas de polímeros plásticos (PET/Al/PET/LLD) en la bolsa de baja permeabilidad a vapor de agua (131 µm grosor), y el combinado de antimicrobianos (Zand y col., 2016).

Para minimizar el posible desarrollo de *C. botulinum* en MAP y vacío (Ikawa y Genigeorgis, 1987; Baker y Genigeorgis, 1990), el envasado MAP en trucha (*Oncorhynchus mykiss*) con tasas bajas de oxígeno (10% O₂ y 50% CO₂, a 1°C) evitan el aumento de BVT, pH e Hx (correlacionado al desarrollo bacteriano a partir del 8° día) ganando en vida útil, no así la oxidación lipídica, tal y como refleja el valor de TBA, donde los mejores resultados los ofrece el envasado a vacío (Giménez y col., 2002), algo ya mostrado por Rodríguez y col. (1999) para esta misma especie. Estos resultados son reproducibles para *Trachurus trachurus* a temperaturas bajas (2°C y 4°C, con 7 y 6 días de vida útil respectivamente) y con un 2% O₂ y 48% CO₂ en la mezcla MAP (Alfaro y col., 2013).

El estudio de atmósferas protectoras, considerada como una técnica mixta de conservación de alimentos, física y química, es un sistema barato y poco complejo para preservar el alimento (Speranza y col., 2009), aplicadas a especies marinas ponen de manifiesto que el uso de tasas moderadas de CO₂ son adecuadas para prolongar la vida útil del pescado, fileteado o en rodajas, presentación que se conoce como “*listo para cocinar*”. En el caso de especies pelágicas, ricas en carne roja, como túnidos y escómbridos, mezclas de CO₂:O₂ prolongan la vida útil casi el doble de días bajo condiciones de refrigeración, proponiendo tasas de 40:60 para el Bonito del Norte (López-Gálvez y col., 1995), o de 70:30 para el *Scomberomorus commerson* (una especie nerítica popular del Índico y del Pacífico Este, Yesudhasan y col, 2010), atendiendo a cualidades sensoriales como el olor y el color,

atributo al cual el oxígeno favorece. Sin embargo, es reconocido el papel que juega el oxígeno, tanto para los fenómenos de autoxidación lipídica (Hultin, 1994; Sohn y col, 2005), como para el desarrollo de las bacterias putrefactivas, principalmente aerobias (Ghaly y col., 2010), pero algunos autores consideran que su presencia es imprescindible para evitar la proliferación de patógenos naturales del medio marino y del pescado como es *Clostridium botulinum* tipo E (Masniyom, 2011). Esta cepa es la más virulenta y peligrosa desde un punto de vista alimentario, al tener unos límites de supervivencia más extremos en relación al resto de cepas. Su desarrollo óptimo tiene lugar a pH 5,0-9,0, por debajo del 5% de sal, entre +3,3° y +45°C, en ambiente anaerobio (Köse, 2010).

Sin embargo, Dufresne y col. (2000) demostraron que la presencia de O₂ en el ambiente de MAP o con uso de films con diferente permeabilidad al oxígeno, en condiciones de temperatura abusiva (12°C) en filetes de trucha, no impide en los 4-5 primeros días la presencia de toxina, pero siempre precedida del deterioro sensorial del producto. Rheinhart (2007) reveló más tarde que la alta permeabilidad de algunos films al oxígeno no impide la formación de toxina botulínica al cabo de unos días en refrigeración (8 días a +4°C y 5 días a +10°C), aunque en ningún momento ofrece valores de tasas de oxígeno durante el tiempo de almacenamiento, destacando siempre que el pescado muestra claros indicios de alteración antes de la aparición de la toxina. Sin embargo, ante estas evidencias, a las que se asumía que el O₂ reprime el desarrollo de *C. botulinum*, no hay muchos más trabajos en este sentido.

Si bien, muchos de los trabajos para incrementar la vida útil de pescado en MAP se orientan a aumentar las tasas de CO₂ para minimizar la flora alterante (Kykkidou y col., 2009), desde un punto de vista comercial tiene como efecto negativo que aumenta el exudado de líquido desde el pescado, afectando al sabor y la textura (Masniyom, 2011).

Yesudhason y col. (2010) incorporan junto con la mezcla gaseosa sorbato potásico al 2%, apreciando una mejor

cualificación sensorial (18 días, frente a los 12 días del lote control envasado en aire), corroborado por una significativa inhibición de la flora aerobia mesófila y manteniendo a los clostridios sulfitorreductores en un nivel invariable hasta los 12 días de almacenamiento.

Mohan y col. (2010), con esta misma especie de escómbrido, reducen la presencia de oxígeno con un secuestrador del mismo, junto con un tratamiento con acetato de sodio y observan un incremento de la vida útil de 25 días (basada en el análisis sensorial), contra los 12 días del lote control, donde la flora psicrotrofa y mesófila total alcanzan niveles de 10^7 ufc/g. En las muestras envasadas en aire domina una flora formada por *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas spp* y *Enterobacteriaceae*, mientras que el efecto del secuestrador de O_2 y el acetato permite el desarrollo de *B. thermosphacta* seguido de *Lactobacillus spp*. En el caso de *Scomber colias japonicus*, una atmósfera de $CO_2:N_2$ (50:50) retarda el desarrollo de la flora primigenia, constituida fundamentalmente por bacterias ácido lácticas, *Brochothrix thermosphacta* y en un segundo plano por *Pseudomonas*, *Shewanella putrefaciens* y *Enterobacteriaceae*, lo cual se refleja también en los niveles de ácido láctico, amonio y los valores de pH (Stamatis y Arkoudelos, 2007). Atendiendo a estos criterios microbiológicos, filetes de 4 especies listas para cocinar (choco, merluza, rubio y estornino) de estructura y flora inicial muy dispar, con atmósferas de 95:5 y 40:30 de $CO_2:O_2$, en todos los casos son aceptables por 14 días en base a parámetros químicos y microbiológicos, pero sensorialmente la mayoría se rechaza a los 10 días salvo el estornino (6 días), donde la flora dominante en MAP está representada por *Pseudomonas* y *Shewanella* (Speranza y col., 2009).

El uso de extractos vegetales para prolongar la vida útil a 3°C de la sardina mediterránea con 9,8% de grasa, sea té o romero (Kenar y col., 2010), ofrece una vida útil de 20 días, frente a los 13 días en lotes control, con valores de BVT inferiores al control (30 mg N/100 g, vs 45 mg N/100 g del control) y de TBA menores a 1 mg/kg (1,4 mg TBA/kg en control), así como valores bajos de ácidos grasos libres, lo

cual indica su efectividad ante la autooxidación lipídica, así como la bacteriana; incluso para *Sardinilla aurita*, los datos son similares (12 días de vida útil para hielo tradicional y 15 días cuyo se emplea a demás extracto de romero al 0,1%; Ozyurt y col., 2012).

Sin embargo, para tasas tan altas de grasa en la composición de la sardina es extraño una vida útil tan alta para el lote control, que difiere con las evaluaciones mostradas por el panel de cata de Galicia en este trabajo, siendo más restrictivos y principalmente debido a sensaciones de rancidez. Esto sugiere que en determinados estudios llevados a cabo por investigadores de países de Mediterráneo oriental son habituales consumidores o están adaptados a productos alimentarios muy aromatizados o con sensaciones fuertes, que se acepta en oriente pero no en el occidente europeo, tal y como Giménez y col (2005) reflejan para salmón refrigerado, ya que indican que las muestras sometidas a extractos vegetales mejoran las cualidades sensoriales (olor y flavor), que camuflarían los indicios de parámetros sensoriales de alteración pero que tampoco tendrían que ver con las sensaciones típicas del pescado, si bien resaltar que no indican los resultados del análisis sensorial cocido; pues el estudio se basa en características externas, y en esquema organoléptico aplicado para bacalao (*Gadus morhua*), que a nuestro entender no puede ser comparable. Sin embargo, dependiendo del uso culinario o tratamiento tecnológico posterior al que se destine esta sardina fresca tratada con extractos vegetales, si podría ser una técnica viable, como por ejemplo congelado, escabechado o ahumado (Erkan y col., 2011, Ozogul y col., 2011).

En resumen, cuanto menor sea la temperatura de refrigeración de conservación de MAP, menor es la formación de aminas, y en particular, la formación de CAD y AGM son las frecuentes hasta estados avanzados de alteración, independiente de la estacionalidad de la especie. La principal causa de rechazo en MAP es la sensación de rancidez, pero la TBA no ha sido determinante como parámetro de frescura, dependiendo de la tasa inicial de grasa (estacional), independiente incluso de la temperatura de refrigeración, pero sí como parámetro de alteración; tasas superiores a 2 mg MDA/kg indican inicio de oxidación vinculada a rancidez. Las MAP con tasa

intermedia de CO_2 sobre la mezcla total, prolonga de 2-3 días sobre su homólogo almacenado en aire. Además, su tasa de formación de aminos biógenos es menor que si se compara almacenada en aire o con tasas superiores de CO_2 , lo cual indica menor desarrollo bacteriano.



4.4. CONSERVAS. EFECTO DEL PROCESO TECNOLÓGICO DE ELABORACIÓN DE CONSERVAS DE SARDINA SOBRE LA INTEGRIDAD DE LA MATERIA PRIMA.

4.4.1. Experimento I. Efecto del tiempo y la temperatura de esterilización sobre la composición química de la sardina y su inocuidad.

España es uno de los principales países productores de conservas de pescado, destacando en primer lugar las elaboradas a partir de especies de túnidos, mejillones y clupeídos (concretamente sardina), en sus diferentes formas de presentación (aceite, tomate, escabeches, y otras salsas; ANFACO, 2016).

Para mejorar la calidad de los productos enlatados, es preciso ejecutar un correcto Código de Buena Práctica de Elaboración, mediante el cual podemos controlar los parámetros tecnológicos (físico-químicos, microbiológicos, reológicos, estado de la materia prima,...) que nos van a influir en la calidad del producto final.

Actualmente, para evaluar la calidad de una conserva según la Normativa Española-Europea, a parte de la presencia de microorganismos y aspectos organolépticos, desde un punto de vista químico relacionado con la posible frescura de la materia prima sólo se presta atención al contenido en Histamina (UE, 2005). Pero en el caso de la familia de los clupeidos, cuando el grado de frescura es deficiente, los contenidos en histamina suelen ser bajos (<50 ppm), tal y como hemos visto hasta ahora. Por ello, conservas con estos valores o inferiores a 100 ppm, se dan por aptas para su consumo, si bien, la materia prima utilizada pudiera ser de pobre calidad (Fernández-Salguero y Mackie, 1987). Es por lo que en el presente trabajo estudiamos el comportamiento de los parámetros que se utilizan normalmente para evaluar el grado de frescura del pescado, a lo largo del proceso de fabricación de conservas de sardinas en aceite vegetal, con el fin de confirmar su utilidad en productos esterilizados. Por otro lado, se aplican parámetros tecnológicos de esterilización inferiores a los aplicados por la Industria Conservera, para comprobar la supervivencia de *Clostridium botulinum* tipo E, y así demostrar a dicha Industria la necesidad de evaluar la microbiología de materias

primas y conseguir productos en conserva más acordes a unas cualidades sensoriales mejoradas, pero sin olvidar los riesgos microbiológicos inherentes a esas materias primas y procesos tecnológicos.

Los datos biométricos de la sardina capturada durante la campaña invernal de 1995, y utilizada para la realización de este experimento, se exponen en la Tabla 37. Se tomaron aleatoriamente de la caja los ejemplares correspondientes al tamaño mínimo de muestra.

La talla de la sardina utilizada en este experimento es la empleada comercialmente en las preparaciones denominadas *Sardinilla*. El 35,7% de los ejemplares lo constituyen hembras, todas ellas con unos ovarios maduros, con huevos naranjas y transparentes, parcialmente desovados. El tamaño corporal de estas hembras es ligeramente superior al de los machos, cuyos testículos están perfectamente maduros y en estado de freza.

Tabla 37. Datos biométricos de la sardina capturada el 7 de Febrero de 1995.

Ejemplar	Peso (g)	Tamaño (mm)	Sexo	Tamaño gónada (mm)
1	14,73	117	♀	45
2	25,13	135	♀	53
3	31,97	146	♀	57
4	24,25	132	♀	56
5	15,05	118	♀	39
6	19,30	125	♀	47
7	21,76	129	♀	43
8	15,66	117	♀	41
9	17,44	120	♀	36
10	13,73	112	♀	39
11	13,49	113	♀	37
12	14,42	120	♀	30
13	10,73	103	♂	26
14	14,12	112	♂	29
MEDIA	18,27±5,85	121,4±11,14	-	41,29±9,68

I - ANALISIS ORGANOLEPTICO: Se procedió al análisis organoléptico de las conservas por parte de 5 jueces entrenados, siendo los valores la media de los resultados Tabla 38. Se puntuó el color del músculo, el de la marca de la espina dorsal, el olor, el sabor

y la textura. Se ha calculado el valor Q (Besteiro y col., 1993) para establecer la clasificación de las conservas en clases comerciales.

Tabla 38. Valores medios de los atributos sensoriales de sardina en conserva en aceite vegetal según tratamiento de esterilización.

Atributos sensorial	115°C		120°C	
	40 min (CAN1)	50 min (CAN2)	40 min (CAN3)	50 min (CAN4)
Color músculo	1,50±0,20	1,87±1,31	2,50±0,41	1,87±0,63
Color zona espina	1,87±0,63	2,00±0,41	2,25±0,29	1,87±0,63
Olor	1,87±0,85	2,37±0,48	2,37±0,25	2,25±0,50
Sabor	2,12±0,63	1,50±0,36	2,25±0,29	1,62±0,51
Textura	1,87±0,60	1,37±0,42	2,25±0,47	1,37±0,38
Valor Q	1,97±0,50	1,64±0,58	2,25±0,40	1,67±0,14

A continuación, se describen los descriptores y comentarios a cada uno de los atributos sensoriales evaluados.

I.A - Color: El producto en conserva que alcanzó la puntuación más baja (1,5) para color del músculo fue el CAN1 (115°C 40 min). El ensayo CAN2 (115°C 50 min) y CAN4 (120°C 50 min) obtuvieron la misma puntuación (1,87) y para el CAN3 (120°C 40 min) la más alta (2,5). La puntuación más baja del color de la espina fue de 1,87 para los procesos CAN1 y CAN4; el CAN2 obtuvo una calificación de 2 y el CAN3 la más alta (2,25).

Las puntuaciones alcanzadas por los diferentes tratamientos en el color nunca fueron la máxima (3) como era de esperar usando sardina fresca, aunque el lote CAN3 alcanzó una puntuación tanto en el color del músculo como el de la espina, mayor de 2. Estudiando estos resultados, sobre todo los de color del músculo donde varió en un punto entre el CAN1 (1,5) y CAN3 (2,5), en los que se usaron el mismo tiempo (40 min), pero diferente temperatura (115°C y 120°C, respectivamente), por lo que podemos concluir que es la temperatura la que tiene mayor influencia en los cambios de color entre los diferentes ensayos. Aunque el panel de cata ha valorado la intensidad crema como mejor en el caso del lote CAN3, frente al CAN1 (color blanco marfil). Pero el color, en el caso de atún rojo, según su captura tipo almadraba, donde se produce estrés en el animal, a una muerte

rápida, sí influye en el color del producto procesado, sea congelado o conserva (Addis y col., 2012).

I.B - Olor: La puntuación dada por los jueces para el olor fue de 1,87 para el proceso CAN1, la más baja; seguido del CAN4 con una puntuación de 2,25 y de 2,37 para CAN2 y CAN3 que alcanzaron la más alta. El lote CAN1 mostró un olor más ligero, de neutro a ligero a pescado salado, mientras que el resto de tratamientos el olor recuerda más a las sensaciones que el consumidor puede encontrar en la mayoría de las conservas comerciales (“típico a sardina”), esto es, con un cierto grado de oxidación, en este caso motivado por un mayor tratamiento en el resto de lotes. Las puntuaciones fueron altas para los lotes CAN2, CAN3 y CAN4.

En este punto apreciamos como los jueces no están lo suficientemente familiarizados con el olor de conserva de sardina realizada con pescado muy fresco, lote CAN1, el lote que se vio menos afectado por la esterilización al emplear el binomio tiempo-temperatura más bajo.

I.C - Sabor: Las puntuaciones más bajas fueron las de CAN2 y CAN4 (1,5 y 1,6 respectivamente), seguidas del proceso CAN1 (2,1) y de CAN3 (2,25). Esto es, se observa que a mayor duración del tratamiento para una temperatura dada, se empeora su calificación. Además sin embargo, al tener en cuenta tratamientos más cortos, para diferentes temperaturas, se valora mejor el lote con tratamiento menos agresivo (CAN3).

En todos los lotes, el sabor fue débil, suave, aunque en CAN2 y CAN4 algún juez definió el descriptor *poco específico “a sardina”* en conserva por lo que alcanzaron una puntuación más baja. El exceso de tiempo y temperatura influyen claramente en el sabor, posiblemente por los compuestos generados en estas condiciones, que se podrían atribuir a degradaciones principalmente de la fracción grasa poliinsaturada. En cualquier caso, Slabyj y True (1978) ya señalaron estas incongruencias sensoriales en el caso de sardinas.

I.D - Textura: La puntuación más baja se ha obtenido para los procesos CAN4 y CAN2 (1,37), seguida del CAN1 (1,87) y la más alta (2,25) para el CAN3. En el caso de los lotes CAN2 y CAN4 su puntuación viene dada por una clara textura seca, ligeramente dura:

Mientras que en los otros 2 lotes su textura era ligeramente blanda, algo jugosa.

Los procesos CAN1 y CAN3, que emplearon un tiempo de 40 min, no deterioraron tanto la textura de la sardina al estar sometida a una esterilización más corta que evitaría su mayor dureza, si bien choca el dato del tratamiento a 120°C 40 min, si bien, no se han encontrado diferencias significativas con respecto al lote CAN1.

I.E - Valor Q: Las puntuaciones más bajas para el valor Q fueron las obtenidas por los procesos CAN2 y CAN4 (1,7), seguida de CAN1 puntuado con un 1,95, la más alta la obtuvo el CAN3 con una puntuación de (2,29), obviamente, acorde a los mejores resultados dados a los atributos evaluados. Los procesos CAN1, CAN2 y CAN4 se clasificaron como clase comercial II (calidad buena o estándar), al tener valores comprendidos entre 1,50 y 2,25. La conserva CAN3 sin embargo, se clasificó como Clase III (Extra) al sobrepasar la puntuación de 2,25, aunque se encontraría en el límite entre clase II y clase III.

II - COMPOSICION: Durante el proceso de elaboración de conservas, pudimos observar la siguiente evolución de la composición para la materia prima. Se ha tenido en cuenta la etapa de salmuero para poder determinar su influencia en la materia prima empleada así como en los compuestos de degradación a estudio.

En la Tabla 39 se expone los valores medios de la composición elemental de la sardina fresca empleada durante este experimento, así como los cambios sufridos en las fases posteriores de cocción y esterilización, según las condiciones técnicas preestablecidas.

II.A – HUMEDAD: La tasa inicial de humedad para la sardina en hielo fue del 78,55%. Se observó como a lo largo del proceso comenzó a descender en la fase de salmuero, un 2,88 %. Continuó este descenso durante la cocción (un 5,37 % respecto a la salmuera) y en las etapas correspondientes a las diferentes esterilizaciones: 115°C 40 min, 115°C 50 min, 120°C 40 min y 120°C 50 min (reducción de 5,69%, 5,37%, 5,9% y 9,52%, respectivamente). El descenso detectado en la fase de salmuero se atribuyó a la salida de agua tisular a la salmuera por diferencias en la presión osmótica.

Tabla 39. Composición elemental de la sardina según etapa de procesado.

Fase de proceso		Agua*	Proteína*	Grasa*	Cenizas*
Sardina fresca	(I)	78,54	17,96	1,49	1,86
Lavado	(II)	76,28	19,06	1,29	3,63
Cocción	(III)	72,18	24,65	1,80	3,86
Esterilización					
115 °C	40 min (CAN1)	68,07	24,22	6,82	3,80
	50 min (CAN2)	68,30	23,04	6,74	4,11
120 °C	40 min (CAN3)	67,92	24,12	5,77	3,73
	50 min (CAN4)	65,31	23,60	5,90	4,17

(*) expresado en % (n=5).

El contenido acuoso descendió como era de esperar en la fase de cocido, que continuó en la fase de esterilización al ser el tratamiento térmico más agresivo, precisamente empleando el binomio 120°C 50 min, donde más se acusó esta disminución, encontrándose diferencias significativas con los otros binomios de tiempo-temperatura disminuyendo su cantidad un 4,11% respecto al valor medio de los otros procesos.

II.B – GRASA: El porcentaje de grasa inicial para la sardina en hielo fue del 1,48%. A lo largo del proceso no sufrió variación en las tres primeras fases (materia prima, salmuera, cocido) pero sí se incrementaron en un 278,8% y 274,4%, en las dos primeras esterilizaciones, y un 220,5% y 227,8% en las dos siguientes, en los cuales la sardina está inmersa en aceite y éste ha penetrado en el músculo de manera evidente, tras 3 meses de maduración.

Este aumento de la cantidad de grasa durante la esterilización fue debido a la eliminación del "efecto barrera" de la grasa subcutánea, que permitiría la entrada de aceite vegetal al tener la sardina una menor tasa de grasa inicial, por encontrarse en estado de reposo reproductivo.

Cara a evaluar qué ocurre con la composición inicial de la fracción grasa, especialmente orientado a sus constituyentes esenciales (ácidos grasos), en la Tabla 40, se exponen los resultados de sardina, utilizando aceite de oliva como líquido de gobierno, y una esterilización de 115°C 40 min y 120°C 40 min.

Tabla 40. Composición de ácidos grasos de sardina fresca (MP) y su correspondiente conserva en aceite de oliva, según tratamiento térmico.

Acido graso*	MP				Conserva			
	Ensayo 115°C,40'		Ensayo 120°C,40'		Ensayo 115°C,40'		Ensayo 120°C,40'	
C12:0	0,1	0,08	0,15	0,2	3,25	0	0	0
C14:0 (Mirístico)	5,3	2	4,51	4,8	0	3,04	3,06	2,57
C14:1 (Miristoleico)	0,2	0	0	0,1	0	0	0	0
C15:0	0,5	0,17	15,87	0,3	0,28	0,25	0,29	0,19
C16:0 (Palmítico)	17,3	13,35	15,87	17,1	15,46	14,46	14,5	13,56
C16:1T	0,4	0,16	0,21	0,5	0,29	0,21	0,28	0,17
C16:1(n-7+n-9)	5,1	2,52	4,96	5,3	2,37	2,87	2,64	2,88
C17:0(Margárico)	1,3	0,34	0,4	1	0,48	0,45	0,53	0,34
C17:1(Margaroleico)	1	0,35	0,69	1,1	0,34	0,4	0,41	0,39
C18:0 (Estearico)	3,8	4,12	3,99	3,1	3,7	4,12	3,79	4,27
C18:1T (Oleico-trans)	0,1	0	0	0,1	0	0	0	0
C18:1n-9 (Oleico)	11,7	59,35	41,03	11,9	44,66	50,2	46,22	55,42
C18:2T (Linoléico-t)	0,6	0,41	1,1	0,8	0,15	0,26	0,28	0,52
C18:2n-6 (Linoléico)	2,2	5,26	3,5	1,9	4,83	4,9	5,34	4,59
C18:3n-6 (Gamma)	0,1	0	0	0,1	0,1	0	0,1	0
C20:0 (Araquídico)	0,9	0,59	0,79	0,9	0,35	0,53	0,38	0,54
C18:3T (Linolénico-trans)	0,2	0	0	0,2	0	0	0	0
C18:3n-3(Linolénico-ALA)	0,9	0,55	0,51	0,6	0,86	0,66	0,82	0,62
C20:1	3,6	0,81	1,9	2,6	3,29	2,29	3,26	1,22
C18:4n-3 (Moroctico)	0,2	0	0	0,2	0	0	0	0
C21:0	2,1	0	0,85	2,2	1,39	0,62	1,06	0,54
C20:2	0,3	0,06	0,12	0,3	0,21	0,13	0,22	0
C20:3n-6	0,3	0,15	0,18	0,2	0,15	0,15	0,15	0,16
C20:3n-3	4,7	0,5	2,09	3,1	4,07	2,39	3,9	1,1
C23:0	1	0,16	0,34	0,9	0,82	0,49	0,7	0,23
C22:2	0,1	0	0	0,0	0	0	0	0
C20:5n-3 (EPA)	9,8	3,48	7,36	13,8	3,37	4,12	2,97	4,23
C24:1 (Nervónico)	1	0	0,25	0,9	0,37	0,12	0,45	0
C22:4n-6 (DTA)	0,5	0,14	0,14	0,5	0,32	0,21	0,28	0,15
C22:5n-3 (DPA)	1,7	0,52	0,93	2,1	0,61	0,77	1,02	0,68
C22:6n-3 (DHA)	16,8	3,79	5,74	14,6	8,04	6,22	7,05	4,61
Saturados	32,4	20,81	27,17	30,5	25,73	23,96	24,31	22,24
Monoinsaturados	23,1	63,03	48,83	22,5	51,03	55,88	52,98	59,91
Poliinsaturados	38,4	14,39	20,45	38,4	22,35	19,42	21,63	16,14
Omega - 3	34,1	8,84	16,63	34,4	16,95	14,16	15,76	11,24
Omega - 6	3,1	5,55	3,82	2,7	5,4	5,26	5,87	4,9
EPA+ DHA	26,6	7,27	13,1	28,4	11,41	10,34	10,02	8,84
Trans	1,3	0,57	1,31	1,6	0,44	0,47	0,56	0,69

(*) Valores expresados como % del total de lípidos.

Se observa que en el producto final, y tras 3 meses de maduración a temperatura ambiente 15-23°C, el músculo de sardina se caracteriza por un enriquecimiento del ácido oleico, mientras que los ácidos grasos omega-3, que caracterizan esta especie en fresco, EPA y DHA, sufren una drástica pérdida, al contrario de lo que indican Selmi y Sadok (2007) para esta misma especie y *Sardinella aurita*. Ambos autores postulan que la tasa grasa no sufre cambios tras etapa de cocción en el perfil de ácidos grasos poliinsaturados (al igual que Aubourg y col.,1997, para atún rabil), y a pesar de embeberse en el aceite usado de líquido de gobierno, enriqueciéndose en ácido oleico, y EPA y DHA disminuyen ligeramente en la conserva (con los mismos parámetros tecnológicos que los usados en este trabajo) respecto a la materia prima, por lo que consideran que la sardina en conserva sigue siendo un alimento rico como fuente de omega-3, y fuente de oleico, lo que lo enriquece nutricionalmente (Sampels, 2015). En el caso de DHA, el más abundante (33,61% respecto al total de ácidos grasos), disminuye un 26% en conserva, y el EPA (6,24%), disminuye un 33,5%. Indicar que la tasa de grasa inicial es baja, 1,16% para *Sardina pilchardus*, lo cual sugiere que con esta tasa, llegar a estas conclusiones pueda resultar prematuro.

Sin embargo, los de este trabajo(n=5) sugieren todo lo contrario. A pesar de su fama en estado crudo, por su riqueza en ácidos DHA y EPA, el tratamiento térmico estándar influye en estos compuestos, reduciendo su tasa, un 72% menos de DHA en el caso del tratamiento 115°C y un 55% a 120°C, y en el caso del EPA, desciende una media de 45% a 115°C y un 73% a 120°C. Su permanencia está vinculada posiblemente a la grasa intramuscular, mientras que la grasa subepidérmica se pierde con los diferentes tratamientos térmicos (cocción y esterilización). En la fase de cocción, la presencia de grasa en el líquido exudado es evidente, y durante la esterilización, otra parte podría diluirse en el aceite de cobertura.

II.C – PROTEÍNA: La cantidad proteína en la sardina mantenida en hielo fue del 17,96%. Esta se mantuvo constante en las dos primeras fases, donde no está implicado el calor (materia prima y salmuera), aumentando en un 6,12% a partir de la etapa de cocción y permaneció más o menos estable a partir de este punto. Esto se

explica, casi con toda seguridad, a la pérdida de agua producida durante la cocción, lo que produjo un efecto de “*concentración de la proteína*”, ya observado en atún (Besteiro y col., 1993).

II.D – CENIZAS: La cantidad inicial de cenizas para la sardina en hielo fue del 1,86%. Estas sufrieron un ligero aumento en la fase de salmuera, de aproximadamente 95%, manteniéndose este valor constante en los procesos a 115°C 40 min y 120°C 40 min, aumentando en un 8 % en los restantes ensayos de esterilización, debido con toda seguridad, a la entrada de sal en el músculo procedente de la salmuera, y pérdida de agua durante la esterilización posterior.

Como resumen, los principales cambios en los procesos de elaboración de conservas de sardina, se vinculan al binomio agua-grasa, tal y como se refleja en la Imagen 140.

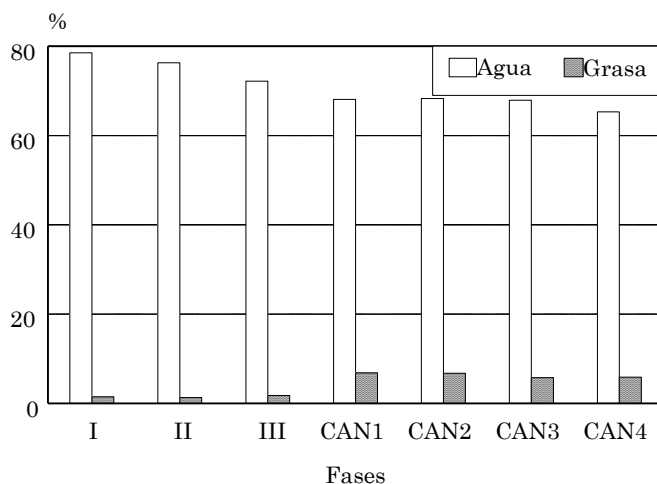


Imagen 140. Evolución del contenido acuoso y graso a lo largo del proceso de elaboración, y entre diferentes tratamientos de esterilización.

III. PARAMETROS DE ALTERACION: En la tabla Tabla 41 se exponen los valores medios de los parámetros de alteración de base nitrogenada volátil, expresados en peso fresco.

Tabla 41. Valores medios de BVT, TMA y DMA, durante las diferentes etapas de procesamiento de conservas.

Fase de proceso		BVT*	TMA*	DMA*
Sardina fresca		15,62±0,54 ^a	0,25±0,09 ^a	0,06±0,07 ^a
Lavado		14,35±0,62 ^a	0,50±0,16 ^a	0,03±0,03 ^a
Cocción		18,62±1,74 ^b	1,70±0,28 ^b	0,21±0,11 ^a
Esterilización				
115° C	40 min	39,77±2,63 ^c	4,94±1,32 ^c	1,92±0,20 ^b
	50 min	39,65±1,02 ^c	8,19±1,21 ^d	2,61±0,17 ^c
120° C	40 min	44,62±1,76 ^d	8,95±0,98 ^d	2,56±0,08 ^c
	50 min	45,50±2,38 ^d	9,12±1,39 ^d	2,71±0,19 ^c

(*) expresado como mg N/100 g. Para cada columna, las medias con la misma letra en superíndice no indican diferencias significativas a un nivel del 5%.

Observando estos datos, se pone de manifiesto que hasta la fase de cocción no existe un incremento de los parámetros químicos basados en la naturaleza nitrogenada volátil, salvo para el caso de la DMA, que aunque parece sufrir un aumento en su contenido, el tratamiento estadístico no justifica tal hecho. Es evidente que durante la fase de esterilización con respecto a las anteriores, el contenido de los parámetros analizados aumenta drásticamente, algo más leve en el tratamiento realizado a menor temperatura y tiempo de esterilización ($p < 0,05$). Sólo en el caso de BVT, las cantidades son más bajas cuando se aplican temperaturas diferentes, independiente del tiempo aplicado.

Pero al igual que en los pocos estudios realizados sobre conservas, la expresión de estos valores en peso fresco es un reflejo erróneo de lo que realmente ocurre durante el procesamiento de conservas. El comportamiento de los parámetros químicos de alteración volátiles se expresan en peso seco libre de grasa (pslg, Tabla 42), ya que el contenido acuoso y lipídico son los que varían con diferencia significativa, tal y como se explicó en el Apartado II.

Durante la cocción se pierde un 8% de agua como máximo y en la esterilización, dependiendo de las condiciones ensayadas (y tras tres meses de maduración de la conserva), se obtiene un producto con una pérdida de humedad comprendida entre el 11 y 15%, y un incremento en materia grasa del 5%; y aunque aparentemente aumentan los valores de proteína y cenizas, este hecho no es más que un efecto provocado por la pérdida de agua, principalmente.

Tabla 42. Valores medios de BVT, TMA y DMA, durante las diferentes etapas de procesamiento de conservas.

Fase de proceso		BVT	TMA	DMA
Sardina fresca		78,45±4,02 ^a	1,27±0,47 ^a	0,29±0,37 ^a
Lavado		64,02±2,81 ^b	2,25±0,71 ^a	0,12±0,15 ^a
Cocción		71,47±5,65 ^{a,b}	6,53±0,98 ^b	0,81±0,42 ^a
Esterilización				
115° C	40 min	158,46±9,96 ^c	19,73±5,34 ^c	7,69±1,00 ^b
	50 min	159,29±9,91 ^c	32,18±4,72 ^d	10,48±0,88 ^c
120° C	40 min	169,85±12,01 ^c	33,99±3,14 ^d	9,74±0,53 ^c
	50 min	158,30±11,06 ^c	31,69±4,75 ^d	9,44±0,79 ^{b,c}

(*) expresado como mg N/100 g peso seco libre de grasa (pslg). Para cada columna, las medias con la misma letra en superíndice no indican diferencias significativas a un nivel del 5%.

III.A - BASES VOLATILES TOTALES: La cantidad inicial de BVT en la sardina en hielo fue de 72,39 mg N/100 g, cantidad mayor que la encontrada en la siguiente experiencia (38,40 mg N/100 g). Esta cantidad disminuyó en la fase de salmuera, 60,51 mg N/100 g; para aumentar ligeramente durante la cocción, 66,83 mg N/100 g.

Sin embargo, se observó un gran aumento durante la fase de esterilización, 124,61 y 125,13 mg/100 g para las conservas CAN1 (115°C 40 min) y CAN2 (115°C 50 min), respectivamente. No se encuentran diferencias significativas entre estos dos procesos de esterilización. Sin embargo, encontramos un nuevo aumento en los tratamientos de CAN3 (120°C 40 min) y CAN4 (120°C 50 min), con 139,13 y 131,26 mg N/100 g, respectivamente, coincidiendo con los tratamientos más agresivos.

El descenso en la fase de salmuera se atribuyó a la lixiviación del BVT en el agua por lavado (Lupín y col., 1993). El aumento ligero

durante la cocción sería producido por el propio tratamiento térmico, que produciría la desaminación de proteínas, amino ácidos y otros compuestos nitrogenados como el OTMA (Gallardo y col., 1990; Bottero y col., 1998).

Este incremento no alcanza los valores de la fase de fresco (materia prima), posiblemente debido a las pérdidas de catabolitos, sobre todo NH_3 durante la cocción, por volatilización y arrastre acuoso con el agua tisular. El claro aumento experimentado durante la esterilización (con un incremento superior al 100% del contenido inicial), fue producido por el tratamiento térmico, que es mucho más energético que la cocción, aumentando mucho la cantidad de BVT al no producirse las pérdidas por lixiviación antes mencionadas para la fase de cocción. Las mayores cantidades encontradas en los tratamientos de 120°C a 40 min y 50 min, coinciden con los tratamientos más agresivos, donde la degradación térmica será mayor.

III.B – AMINAS DERIVADAS DEL OTMA: TMA Y DMA:

Las cantidades iniciales de TMA para la materia prima fueron de 1,19 mg N/100g, aumentando durante la estancia en salmuera hasta 2,12 mg N/100g. Continúa el aumento durante la cocción (6,10 mg N/100 g) y un aumento en mayor proporción durante la esterilización. Encontramos diferencias ($p < 0,05$) entre las diferentes esterilizaciones. Se obtuvo la cantidad más baja en el proceso de esterilización CAN1 (115°C 40 min, con 15,56 mg N/100 g), aumentando en el lote CAN2 (25,68 mg/100 g), y manteniéndose en torno a esta cantidad en los dos tratamientos, CAN3 y CAN4.

Examinando la evolución de TMA, comparando con la evolución de BVT, se observa que ésta aumenta lentamente a lo largo del proceso, siendo este aumento significativamente mayor en las etapas en las que está implicado el calor. Hay que tener en cuenta la influencia del descenso en la tasa de humedad lo que provocaría un aumento en la concentración de TMA, como en el caso de BVT.

El aumento a lo largo del proceso antes de las fases donde se aplica calor, se explica por la continua degradación del OTMA a TMA a temperatura ambiente por reducción bacteriana (teniendo en cuenta que hay pérdidas por lavado del agua de salmuera, por tanto el valor real podría ser más alto), viéndose realmente este incremento en la

fase de cocido y posterior esterilización, donde ya se aplica una mayor temperatura (Tokunaga, 1975a; Taguchi y col., 1980; Shirai y col., 1988; Besteiro y col., 1993). El aumento durante la cocción fue posiblemente menor que el esperado debido a pérdidas por arrastre acuoso del líquido tisular y/o volatilización.

El incremento fue mucho mayor en la fase de enlatado. Este aumento fue debido al tratamiento más agresivo, a mayor temperatura y durante más tiempo que en la fase de cocción, unido a que se evitan pérdidas por exudado tisular al ser el envase hermético (Yeannes, 1988).

Se observó por tanto, que la temperatura fue el principal implicado durante el proceso en la degradación del OTMA a TMA y DMA de acuerdo con Gallardo y col. (1990), al encontrar diferencias entre el procesado CAN1 y CAN2, donde sólo cambia la temperatura.

Durante la elaboración de sardinas en conserva, respecto a BVT, se observa una pérdida de los componentes volátiles, principalmente NH_3 , durante la fase de lavado en salmuera posiblemente como efecto de fenómenos osmóticos (salida de amonio y entrada de cloruros), valor que se incrementa ligeramente durante la siguiente fase de cocción ($p > 0,05$). En cuanto TMA y DMA, en ambos casos la tendencia es a aumentar durante el desarrollo de las tres primeras fases, pero este incremento sólo es real durante la cocción para la TMA.

Ya durante la fase de esterilización, se observa una diferencia para BVT respecto a su expresión en peso fresco. No se observan diferencias significativas para el contenido de nitrógeno volátil independientemente de la temperatura y tiempo aplicados, hecho que sí ocurriría si se expresa en peso fresco (diferencias entre temperaturas de trabajo). Sólo en el caso de TMA y DMA, tal y como ocurriría si se expresa en peso fresco, al aplicar menor tiempo y temperatura de esterilización, los valores obtenidos son más bajos ($p < 0,05$), con 19,73 y 7,69 mg N/100 p.s.l.g., respectivamente.

En la

Imagen 141 se representa la generación de los compuestos nitrogenados volátiles (BVT y TMA).

Estos parámetros indican el grado de alteración en el pescado fresco son buenos indicadores del grado de frescura para ciertas especies de pescado (Pérez-Villareal y Howgate, 1987; Yamanaka y Matsumoto, 1989; Rodríguez y col., 1991; Gram, 1992). Tokunaga y col. (1975b) proponen el uso de la relación de DMA/TMA como indicador de la materia prima inicial, que tiene cierto sentido a nuestro entender, si se partiese de materia prima congelada. Slabyj y True (1978) ya sugirieron la TMA en conservas como indicador de la materia prima, y sin embargo no tener en cuenta el análisis sensorial en esta primera etapa, pues según el proceso aplicado, lote con una calidad sensorial óptima en materia prima, en producto terminado son rechazados. En cualquier caso, a pesar de este incremento como algo normal en el procesado térmico, estos niveles se mantienen estables a lo menos hasta 10 meses de maduración (Rodríguez y col., 1997b).

Estos parámetros son producidos mayoritariamente por mecanismos bacterianos a lo largo del periodo de almacenamiento en pescado fresco (Gram, 1992; Oehlenschläger, 1997; Gram y Dalgaard, 2002; Howgate, 2010b; Oehlenschläger, 2014); sin embargo, durante el proceso de fabricación de conservas observamos que BVT disminuye durante la cocción, la posible explicación es la pérdida de catabolitos, sobre todo NH_3 , por volatilización o arrastre con el agua tisular, fenómeno también observado por Besteiro y col. (1993) en conservas de atún (*Thunnus albacares*).

Durante la fase de esterilización, la materia prima en conserva es sometida a un tratamiento térmico enérgico y en esta fase observamos un incremento de 100 veces superior al contenido inicial, no encontrando diferencias significativas entre los cuatro tratamientos de esterilización. Esto lo podemos explicar porque durante la cocción es conocido que bacterias y enzimas son destruidas (en su mayor parte) y es por lo que la formación de BVT sólo puede ser atribuida a una degradación no enzimática causada por el tratamiento térmico.

Sin embargo, la TMA aumenta, aunque lentamente, durante todo el proceso de fabricación, encontrando diferencias significativas entre las fases de recepción de materia prima y salmuera con la fase de cocción y la fase de esterilización.

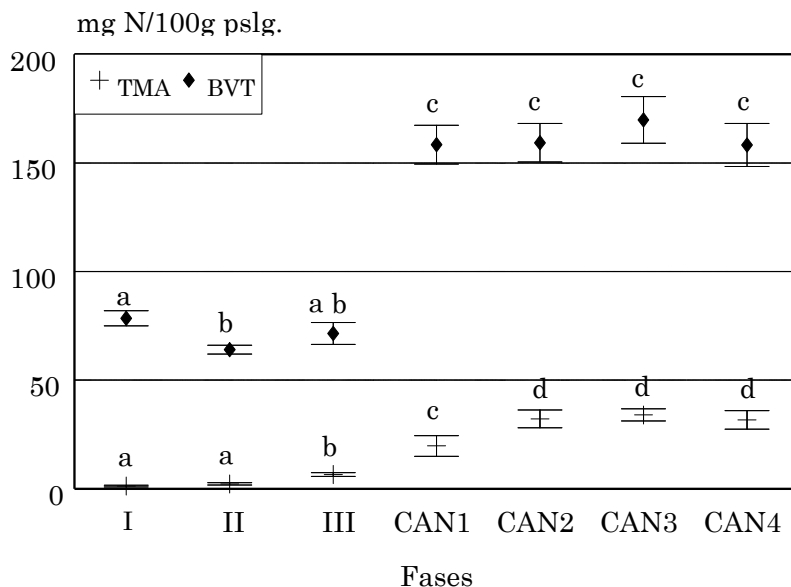


Imagen 141. Evolución de TMA y BVT a lo largo del proceso de elaboración, y entre diferentes tratamientos de esterilización. Las letras iguales para cada parámetro no indican diferencias ($P > 0.05$). pslg. = peso seco libre de grasa.

Señalar que durante la elaboración de las conservas, la temperatura ambiente de trabajo fue de 20-22°C, y el proceso duró entre 3 y 4 horas. Por propia experiencia, y confirmado por la bibliografía (Yamanaka y col., 1986; Veciana-Nogués y col., 1990; Veciana, 1993; Veciana y col., 1995), en esta especie se sabe que con estas condiciones de trabajo, tanto BVT como TMA no aumentan más que un 20-30% con relación a la tasa inicial. En nuestro caso, la TMA en la fase de cocción sufre un incremento superior a un 400%, esto sólo se puede atribuir a una reducción del óxido de trimetilamina (TMAO) por el calor (Tokunaga, 1975a; Shirai y col., 1988; Besteiro y col., 1993), que se acentúa en las fases de esterilización.

En general, en los diferentes tratamientos de esterilización se observan diferencias significativas entre CAN1 (115°C, 40 min.) con el resto, cuya temperatura y tiempo utilizado fue menor; con los otros tratamientos térmicos (CAN2, CAN3, y CAN4) la reducción del TMAO fue total. Pero este OTMA inicial también se reduce

térmicamente a DMA, aunque la vía principal es hacia la TMA. La DMA se forma en pescados congelados vía enzimática, principalmente (Mansilla, 2002). En pescado refrigerado (0-10°C), la actividad de la enzima OTMA demetilasa es baja y transcurre lentamente por lo que es más probable un agotamiento de la tasa inicial de OTMA por las bacterias a TMA (Castell y col., 1974; Gram y Dalgaard, 2002).

Durante la elaboración de conservas, la fase de cocción con el tiempo y la temperatura de trabajo aplicados, es suficiente para desnaturalizar la enzima formadora de DMA, por lo que la generación de DMA durante el proceso completo de conserva sólo se puede atribuir a un efecto térmico al igual que ocurre con la TMA y las BVT. De la cantidad de nitrógeno de OTMA inicial que llega hasta la conserva, el 77,05% se reduce a nitrógeno de TMA mientras que el resto lo constituye la DMA.

Con el fin de evaluar la descomposición térmica del OTMA, se realizó una prueba paralela con muestras de sardina adquiridas en un mercado local, con una calificación sensorial de clase A (según escala de la UE). A estos ejemplares se les aplicó un tratamiento similar al caso anterior aunque sólo se empleó una temperatura y tiempo de esterilización en función de lo observado anteriormente (120°C durante 40 minutos).

En la Tabla 43 se exponen los valores obtenidos del OTMA y sus catabolitos así como su porcentaje de grasa y agua para cada fase del proceso.

Al igual que en anteriores ocasiones, durante el proceso de elaboración de conservas, existe una pérdida de agua en torno al 19% y una ganancia en peso de la grasa del 287%. Aparentemente, no se aprecian diferencias significativas entre las cantidades de OTMA en las fases de materia prima y fase de cocción, pero sí con la de esterilización, donde el OTMA inicial ha desaparecido. Se observa un incremento en todas las fases de la TMA ($p < 0,05$) alcanzando un valor de 10,18 mg N/100g. En el caso de la DMA, sólo se observa un incremento significativo durante la fase de esterilización (2,95 mg N/100 g). Las BVT siguen el patrón explicado para la experiencia anterior, es decir, sufre un ligero aumento (aparente) durante la fase de

cocción ($p>0,05$) para aumentar drásticamente durante la fase de esterilización.

Tabla 43. Valores medios de OTMA y sus catabolitos durante la elaboración de conservas de sardina.

Fase del proceso	OTMA*	TMA*	DMA*	BVT*	Agua ⁺	Lípidos ⁺
Sardina fresca	13,29 $\pm 0,75^a$	0,31 $\pm 0,08^a$	0 ^a	29,51 $\pm 2,00^a$	78,63 $\pm 0,24$	2,04 $\pm 0,10$
Cocción	12,5 $1 \pm 1,01^a$	1,37 $\pm 0,14^b$	0,01 $\pm 0,03^a$	29,68 $\pm 2,69^a$	68,76 $\pm 0,41$	3,20 $\pm 0,21$
Esterilización	0 ^b	10,18 $\pm 0,43^c$	2,95 $\pm 0,12^b$	51,27 $\pm 4,52^b$	63,42 $\pm 0,72$	7,91 $\pm 0,47$

(*) expresado en peso fresco (mg N/100g); (†) expresado como %. Para cada columna, las medias con la misma letra en superíndice no indican diferencias significativas a un nivel del 5%.

Como en casos anteriores, y con el fin de evitar las interferencias ocasionadas por la pérdida de agua y la ganancia de grasa, los datos se transforman y expresan en peso seco libre de grasa (Tabla 44).

Tabla 44. Valores medios de aminas volátiles durante la elaboración de conservas de sardina, expresado en peso seco libre de grasa (mg N/100g p.s.l.g.)

Fase del proceso	OTMA	TMA	DMA	BVT
Sardina fresca	68,75 $\pm 3,44^a$	1,59 $\pm 0,38^a$	0 ^a	152,75 $\pm 11,86^a$
Cocción	44,67 $\pm 4,56^b$	4,90 $\pm 0,43^b$	0,04 $\pm 0,09^a$	105,96 $\pm 11,29^b$
Esterilización	0 ^c	35,52 $\pm 1,03^c$	10,30 $\pm 0,33^b$	178,87 $\pm 18,80^a$

Para cada columna, las medias con la misma letra en superíndice no indican diferencias significativas a un nivel del 5%.

Observando los valores obtenidos, descontando el contenido acuoso y graso, es patente para el OTMA que sufre una pérdida significativa a lo largo del proceso, pérdida que se traduce en un incremento significativo para el caso de la TMA y sólo durante la fase de esterilización para la DMA. Las bases BVT, las cuales incluyen TMA y DMA, sufre una pérdida ($p<0,05$) de su contenido inicial durante la fase de cocción por volatilización posiblemente del NH_3 , constituyente mayoritario. Finalmente, durante la fase de

esterilización, el valor de BVT aumenta significativamente sólo con respecto a la fase de cocción.

En la sardina fresca, la TMA representa en torno a un 1% de las BVT, mientras que la DMA representa un 0%. Durante las fases de cocción y esterilización, la TMA representa con relación a las BVT un 4,5% y un 20%, respectivamente mientras que la DMA supone un 0% y un 5%, respectivamente.

Si sumamos el contenido de Nitrógeno de OTMA, TMA y DMA en sardina fresca, esta suma nos da un valor próximo al contenido hipotético inicial del OTMA durante la vida del pescado, esto es, tendría 13,60 mg N OTMA/100 g de peso fresco. Aplicando este criterio pero expresado en peso seco libre de grasa, el contenido de N total del OTMA y sus catabolitos baja desde un 70,34 mg N/100 g p.s.l.g. en la materia prima inicial hasta un 49,61 mg N/100 g p.s.l.g. durante la cocción y hasta 45,82 mg N/100 g p.s.l.g. en el producto terminado. Es decir, durante el proceso de conservas de sardina hay una pérdida de nitrógeno correspondiente a OTMA inicial de en torno al 34,86%. El 65,14% restante lo constituyen el nitrógeno de la TMA y DMA. En la conserva final, de este nitrógeno residual, el nitrógeno de la TMA representa el 77,51% del nitrógeno reducido del OTMA que ha perdurado hasta la elaboración de dicha conserva. Este valor es muy similar ($p>0,05$) si lo comparamos con el experimento realizado al principio de este capítulo, a 120°C durante 40 y 50 minutos, con una tasa del 77,73% y 77,05%, respectivamente. En el caso de las pruebas realizadas a 115°C durante 40 y 50 minutos, la tasa de nitrógeno de TMA ha sido del 71,95 y 75,43%, respectivamente, algo más bajas con relación a la obtenida en este experimento ($p<0,05$).

Durante las diferentes fases del proceso, el N de TMA con relación al contenido de N de OTMA y sus catabolitos para cada fase, aumenta desde un 2,25% en sardina fresca, a 9,97% durante la cocción y finalmente hasta 77,05% durante la esterilización. Sin embargo, parece evidente que en las condiciones de procesado y esterilización ensayadas de temperatura y tiempo, así como el estado fresco de la materia prima, el N de TMA que permanece en la conserva final representa entre un 71 y 78% del N total reducido del OTMA original.

En la Tabla 45 se indica la relación correspondiente de N de TMA y DMA respecto al contenido hipotético inicial de N de OTMA, tanto en peso fresco como en producto seco libre de grasa

Tabla 45. Porcentajes de N TMA y DMA respecto al contenido inicial de N de OTMA inicial (teórico) durante la elaboración de conservas de sardina, expresado en peso fresco (A) y en peso seco libre de grasa (B).

Fase del proceso	A (13,60 mg N OTMA/100g)		B (70,34 mg N OTMA/100g.s.l.g.)	
	TMA	DMA	TMA	DMA
Sardina fresca	2,28 ^a	0 ^a	2,26 ^a	0 ^a
Cocción	10,07 ^b	0,07 ^b	6,97 ^b	0,06 ^b
Esterilización	74,85 ^c	21,69 ^c	50,50 ^c	14,64 ^c

Para cada columna, las medias con la misma letra en superíndice no indican diferencias significativas a un nivel del 5%.

Por los datos mostrados en la columna A (peso fresco), los valores de N de TMA y DMA correspondientes a la fase de esterilización parecen indicar que no han existido prácticamente pérdidas de N de OTMA, su suma supone un 96,54% de N OTMA reducido y remanente en el músculo de la sardina esterilizada. Sin embargo, los valores mostrados en peso seco libre de grasa (columna B) indican lo contrario, esto es, hay una pérdida importante del contenido inicial de N OTMA durante el proceso de elaboración, en torno al 34,86%, reduciéndose la mitad como N de TMA, principalmente.

Lo que sí está claro, es la existencia de una reducción térmica del contenido de OTMA de la sardina fresca durante su elaboración como producto en conserva. Las pérdidas correspondientes al N de OTMA no está claro si desaparece por volatilización como parte de TMA o como DMA, o bien, este OTMA desaparece por volatilización como tal, se transforma en otros productos o se liga a otros componentes. En este punto sería de interés un estudio profundo del espacio de cabeza del cocedor durante la fase de cocción, que es dónde tiene lugar la mayor pérdida del N de OTMA, y de la conserva mediante un análisis por cromatografía gaseosa, técnica la cual no disponemos. Este

estudio clarificaría si realmente existe una formación importante de TMA que se volatiliza, tal y como algunos autores postulan.

III. AMINAS BIOGENAS: Continuando con el experimento de aplicar diferentes tiempos y temperaturas de esterilización a sardina fresca, en la Tabla 46 se exponen los valores medios de aminas biógenas encontrados en la materia prima así como en su posterior elaboración como producto en conserva. Los valores se ofrecen tanto en peso fresco como en peso seco libre de grasa.

Tabla 46. Contenido medio en aminas biógenas a lo largo del proceso de elaboración de sardina, expresado en $\mu\text{g/g}$ peso fresco (columna A) y $\mu\text{g/g}$ peso seco libre de grasa (columna B).

FASE	AMINAS BIÓGENAS					
	A			B		
	PUT	SPN	SPA	PUT	SPN	SPA
Fresco	1,98 ^a	5,49 ^a	8,70 ^a	9,97 ^a	27,56 ^a	43,72 ^{a,b}
Lavado	4,11 ^b	7,54 ^b	10,66 ^b	16,22 ^b	29,81 ^a	42,14 ^a
Cocción	5,99 ^c	10,52 ^c	12,65 ^c	23,13 ^c	40,58 ^b	48,79 ^b
CAN1	5,43 ^c	8,85 ^{c,d}	8,24 ^a	21,67 ^c	35,31 ^b	32,90 ^c
CAN2	5,68 ^c	9,46 ^c	9,31 ^{a,b}	22,81 ^c	38,04 ^b	37,44 ^c
CAN3	5,93 ^c	9,73 ^c	9,47 ^{a,b}	22,61 ^c	37,02 ^b	36,01 ^c
CAN4	4,87 ^c	7,81 ^{b,d}	7,89 ^a	16,91 ^b	27,15 ^a	27,37 ^d

Para cada columna, las medias con la misma letra en superíndice no indican diferencias significativas a un nivel del 5%.

En nuestras sardinas frescas, a su recepción en el laboratorio, hemos identificado las siguientes aminas biógenas: putrescina (PUT), espermidina (SPN) y espermina (SPA). Estas aminas han sido ya citadas para otras especies como existentes en el individuo *in vivo* (Yamanaka y col., 1989; Rodríguez y col., 1992; Rodríguez y col., 1999). La ausencia de otras aminas indica que el grado de frescura de la materia prima es excelente así como que todavía no ha tenido lugar una invasión microbiana del músculo importante.

Observando los datos reflejados en la columna A (en peso fresco), la putrescina aumenta ligeramente ($p < 0,05$) hasta la fase de cocción para mantenerse estable durante los posteriores tratamientos térmicos de esterilización. El incremento que tiene lugar hasta la fase de lavado en salmuera puede ser explicado por un efecto conjunto de enzimas

autolíticas y bacterianas ya que durante este proceso se trabaja a temperaturas de en torno a 20°C y la manipulación (corte, eviscerado, goles,...), factores que favorecen esta formación. En la fase de cocción, la pérdida importante de agua hace que parezca que la PUT aumente drásticamente, si bien durante el escurrido, corte, colocación de las piezas en las latas, labores realizadas previas a la cocción, el tiempo (2 horas) y temperatura de trabajo (20°C) transcurridos explican parcialmente un incremento de la PUT por parte de enzimas endógenas y bacterias. Estos valores son similares a los encontrados para especies como el boquerón (Veciana y col., 1989) durante su almacenamiento a temperaturas cercanas a 20°C. Durante la fase de esterilización, la pérdida de agua es ligeramente inferior a la fase anterior, y como durante la cocción, enzimas y bacterias son destruidas, la tasa de esta amina permanece constante.

Con la espermidina y espermina ocurre algo similar que la putrescina durante el desarrollo de las tres primeras fases; sin embargo, durante la esterilización la SPN sufre un ligero descenso no significativo con respecto a la fase de cocción salvo en el tratamiento CAN4 ($p < 0,05$). En el caso de la SPA, durante la esterilización existe una pérdida de esta amina en todos los tratamientos de esterilización aplicados ($p < 0,05$). Con el fin de determinar si realmente existen estos incrementos durante las tres primeras fases y poder establecer lo que ocurre durante la esterilización, los valores se transforman a peso seco libre de grasa, para eliminar las posibles distorsiones que puedan ocasionar los componentes nutricionales que varían significativamente durante el proceso de elaboración de conservas. SPN y SPA también caen en el atún *Thunnus albacares* en conserva (Veciana-Nogues y col., 1997b).

Durante el proceso de elaboración de la conserva, la putrescina se incrementa en 12,5 µg/g p.s.l.g. (3 µg/g en peso fresco), esto es debido, al igual que como ocurre con la TMA, a una acción bacteriana y/o enzimática hasta la fase de cocción donde se eliminan parte de microorganismos y se desnaturalizan algunas enzimas. En la fase de esterilización, el nivel de la citada amina se mantiene con respecto a la fase anterior, salvo en el caso de CAN4, donde al aplicar más tiempo y temperatura de esterilización, la putrescina se pierde en el agua del

líquido de gobierno, disminuyendo su contenido en el músculo ($p<0,05$).

Con la espermidina ocurre lo mismo que con la putrescina. Sin embargo, la espermina, que es la más abundante en origen, aumenta significativamente hasta la fase de cocción, y durante la esterilización disminuye ($p<0,05$) en 10 $\mu\text{g/g}$ p.s.l.g., salvo en el caso de CAN4 dónde el descenso es bastante más significativo (de 20 $\mu\text{g/g}$ p.s.l.g.).

Sin lugar a dudas, en materia prima y conservas, la amina biógena más estudiada es la histamina. Para idénticas condiciones de almacenamiento en refrigeración (entre 4, 10 y 22°C), la formación de HIS es mayor según aumenta la temperatura, y es también dependiente de la especie. Así, el atún listado (*Katsuwonus pelamis*) genera más HIS que *Thunnus obesus*, debido a una mayor presencia del aminoácido histidina libre (Silva y col., 1998), pero no se genera por debajo de 4°C. Luten y col., en su estudio sobre el contenido en aminas biógenas en conservas de atún y caballa, observa que todas las aminas disminuyen significativamente sólo en las conservas de caballa, pero estacamos que las condiciones de trabajo de la preparación de caballa eran totalmente diferentes a las de atún, tanto en tiempos y temperaturas de esterilización, como de la salsa empleada (una acuosa y otra oleosa, respectivamente). Finalmente, la demora preproceso de conservas en condiciones no adecuadas de almacenamiento, favorecen la formación de HIS pero a distintos niveles según la especie. Jeya-Shakila y col. (2005), con atún listado y Sardina, durante 6 h a +30°C. Así, indican que mientras el túnido se clasificó sensorialmente como apto, la sardina se clasificó como alterada, sin superar las 14 y 8 ppm de HIS, respectivamente. Tras la esterilización, TMA y BVT aumentan en sardina, pero con un descenso acusado de la histamina (< 4 ppm),

El estudio comparativo entre las aminas volátiles y las aminas biógenas nos pone de manifiesto que estas últimas no se ven afectadas por el proceso de esterilización, en las condiciones ensayadas (CAN1, CAN2 y CAN3), aunque aparentemente parece existir una tendencia a perder cierto contenido ($p>0,05$), tal y como Veciana y col (1997b) observaron para conservas de atún. Sin embargo, con tratamientos más enérgicos, el contenido en aminas biógenas disminuye (CAN4),

tal y como queda reflejado en los resultados del presente trabajo. Las altas presiones que se ejercen en la lata durante periodos prolongados fuerzan a una salida de las aminas biógenas hacia el líquido de gobierno. Rodríguez y col (1996) señalan algo similar con respecto a la amina Histamina; empleando sardina alterada y aplicando temperaturas de 120 y 126°C durante el mismo tiempo de esterilización, la histamina se pierde en parte en el líquido de cobertura (agua tisular exudada) cuanto mayor es el tratamiento térmico; es de destacar que aunque a penas se aprecian diferencias significativas, estos autores observan un descenso ligero de histamina ya durante la fase de cocción. Farn y Sims (1987) observan un fenómeno similar durante la elaboración de túnidos en conserva, proponiéndose la PUT y CAD como indicadores de alteración de *Katsuwonus pelamis* por la alta correlación con el análisis sensorial (Sims y col., 1992).

IV. CATABOLITOS DEL ATP: Los 5'-nucleótidos y purinas derivadas del ATP presentes en la sardina recién capturada y su variación a lo largo del proceso de elaboración de conservas se muestran en la Tabla 47.

Tabla 47. Contenido medio en 5'-nucleótidos y purinas derivadas del ATP a lo largo del proceso de elaboración de sardina.

FASE	CATABOLITOS DEL ATP*					
	5'-nucleótidos				Purinas	
	ATP	ADP	AMP	IMP	HxR	Hx
Fresco	0,01 ^a	0,23 ^a	0,06 ^a	4,78 ^a	0,98 ^a	0,56 ^a
Lavado	0,01 ^a	0,18 ^a	0,05 ^a	4,26 ^a	0,94 ^a	0,52 ^a
Cocción	0,03 ^a	0,12 ^b	0,18 ^b	4,21 ^a	1,02 ^a	0,60 ^a
CAN1	0	0	0,27 ^{b,c}	2,37 ^b	1,19 ^{a,b}	0,48 ^a
CAN2	0	0	0,35 ^c	3,10 ^b	1,42 ^b	0,64 ^{a,b}
CAN3	0	0	0,33 ^c	2,93 ^b	1,82 ^c	0,76 ^b
CAN4	0	0	0,30 ^c	2,45 ^b	1,96 ^c	0,69 ^b

(*) expresado en $\mu\text{mol/g}$ peso fresco. Para cada columna, las medias con la misma letra en superíndice no indican diferencias significativas a un nivel del 5%.

Como se puede observar los niveles de ATP, ADP y AMP son muy bajos en la fase de recepción de la materia prima, donde el ATP

está prácticamente agotado. El catabolito dominante en esta fase es el IMP, que alcanza un valor de 4,78 $\mu\text{mol/g}$, seguido por inosina (0,98 $\mu\text{mol HxR/g}$) e hipoxantina (0,56 $\mu\text{mol Hx/g}$). Estos valores indican una escasa degradación autolítica del músculo del pescado. Así, en el desarrollo del experimento del siguiente experimento (ver capítulo 4.3.2), los valores medios de los tres últimos catabolitos del ATP en el día 0 (día de captura) han sido muy similares a los obtenidos en este experimento (4,79; 0,50 y 0,27 $\mu\text{mol/g}$, para IMP, HxR y Hx, respectivamente).

A nivel de HxR y Hx, se observa una diferencia significativa ya que en el experimento siguiente, los contenidos iniciales de estas purinas eran ligeramente inferiores a los del experimento actual. La captura de la sardina, su recepción a bordo y posterior manipulación y conservación hasta el momento de los análisis ha sido igual, por lo que toda esta manipulación previa podría explicar en parte esta diferencia, esto es, durante la captura y estrés del animal (Addis y col., 2012), y la temperatura, tanto del agua como del ambiente del parque de pesca, en el mes de febrero como de Junio es muy dispar. Sin embargo, lo más lógico sería que los contenidos de HxR e Hx fuesen mayores para el mes de Junio, al contrario de lo que ocurre en este caso.

Esta diferencia es debida a factores intrínsecos a la propia naturaleza de la sardina; así, mientras en el mes de Junio el contenido medio de ATP inicial, estimado como la suma del ATP y los compuestos relacionados de su degradación, fue de 5,95 $\mu\text{mol/g}$; en el mes de febrero ha sido de 6,62 $\mu\text{mol/g}$, ligeramente más alto en la época invernal. Posiblemente su actividad enzimática HxRderibosa se halla mucho más elevada en tiempo invernal, lo cual justificaría esta diferencia observada entre ambos meses.

Ya durante el proceso de elaboración de conservas, el ATP y ADP permanecen constantes hasta el momento de la fase de cocción donde el ADP sufre un ligero descenso en sus niveles. En la fase de esterilización, independientemente del tratamiento térmico aplicado, ATP y ADP disminuyen hasta niveles no detectables ($p < 0,05$). Por el contrario, el AMP aumenta significativamente durante las fases de tratamientos térmicos, esto es, cocción y esterilización. En esta última

fase, el empleo de temperaturas más bajas y menor tiempo de esterilización ofrece valores más bajos ($p < 0,05$) de este 5'-nucleótido con respecto a los otros tratamientos de esterilización.

El IMP disminuye significativamente durante el proceso de elaboración de conservas, sufriendo hasta una pérdida de la mitad de su contenido inicial, según el tratamiento de esterilización aplicado. Por el contrario, la HxR aumenta ($p < 0,05$) durante la fase de esterilización, hasta casi el doble cuando se aplica un tratamiento térmico más agresivo (CAN3 y CAN4, a 120°C). La Hx permanece constante hasta la fase de esterilización, que aunque aparentemente aumenta en todos los tratamientos térmicos aplicados, sólo lo hace de una forma significativa cuando se aplican temperaturas de esterilización más elevadas, independientemente de los tiempos ensayados (40 y 50 minutos).

Estos valores parecen poner de manifiesto que durante el proceso de elaboración de conservas de sardina el ATP y ADP se degradan para generar AMP, mientras que el IMP se transforma a HxR; la cantidad de HxR es mayor cuanto mayor sea la temperatura del tratamiento térmico. La HxR se degrada parcialmente al mismo tiempo hasta Hx, sólo en el caso de aplicación de tratamientos térmicos más severos, esto es, a mayor temperatura, si bien, el paso de HxR a Hx no es tan importante como el de IMP a HxR.

El contenido medio de AMP (0,31 $\mu\text{mol/g}$) durante las pruebas de esterilización indican que ha ganado 0,25 $\mu\text{mol/g}$ respecto a la fase de materia prima (sardina fresca) a expensas del ATP y ADP, cuya suma en sardina fresca supone 0,24 $\mu\text{mol/g}$. Por otro lado, el IMP pierde 2,07 $\mu\text{mol/g}$ en general durante la fase de esterilización (valor medio de 2,71 $\mu\text{mol IMP/g}$) respecto a la sardina fresca, parte del cual pasa a HxR (0,37 y 0,91 $\mu\text{mol/g}$ que gana en la esterilización a 115°C y 120°C, respectivamente). De esta HxR, parte pasa a Hx durante la esterilización comercial, 0,17 $\mu\text{mol/g}$ que gana en la esterilización a 120°C, mientras que a 115°C permanece constante. Es evidente que existe una pérdida importante durante el proceso de esterilización de parte de alguno de estos 5'-nucleótidos o purinas (pérdida media durante la esterilización de 1,37 $\mu\text{mol/g}$ a 115°C y 0,99 $\mu\text{mol/g}$ a 120°C).

Para estimar estas pérdidas, partimos de la idea que la suma del ATP de las muestras y de todos los compuestos derivados de la degradación del mismo (Σ ATP), tiene que reflejar el contenido inicial de ATP en el organismo vivo.

En la materia prima, los niveles de ATP *in vivo*, o la cinética ATPasa mostrada en etapas iniciales tras su captura, dependen de varios factores intrínsecos, como se observó al comparar entre especies de peces marinos y de agua dulce (Howgate, 2005; Howgate, 2006), y entre diversas especies marinas (Guderley, 2004), diferente actividad ATPasa según especie de cultivo (Ozogul y col., 2010a; Ozogul y col., 2010b), según el tipo de músculo claro y oscuro (o rojo), éste último mayor proporción en especies pelágicas, pero su actividad ATPasa es mayor en el músculo blanco (Johnston y Moon, 1980; Shirai y col., 1988; Watabe y col., 1989; Gill y col., 1989; Hattula, 1997; Howgate, 2006) con mayor tasa de fosfato de creatina y ATP, que es el doble del músculo rojo en la sardina (Watabe y col., 1991) o en *Cyprinus carpio* (Li y col., 2016), el tipo de captura, ya que situaciones de estrés pueden inducir a una bajada del ATP de hasta el 80% en el músculo blanco (Dobson y col., 1987; McDonald y col., 1998), el tamaño o edad (Cann-Moisan y col., 1989) y dependiente de la época de captura o cosecha como se demostró en dorada y salmón (Grigorakis y col., 2003; Morkore y col., 2010), ... por lo que los valores iniciales de ATP pueden ser muy diferentes. En nuestro caso, trabajamos con un *pool* del músculo (filetes) de 5-6 ejemplares para cada réplica (n=5), lo cual minimiza posibles distorsiones de los resultados respecto al sexo de los ejemplares; las otras variables mencionadas (talla, edad, estado reproductor, tipo de músculo) no suponen un grave problema ya que los ejemplares de sardina de este trabajo son muy homogéneos en estos aspectos, mientras que el músculo blanco y oscuro no se discriminan, homogeneizándolos simultáneamente. Así, y comparado estos niveles (total de ATP y sus catabolitos= 6,62 $\mu\text{mol/g}$) con los del experimento siguiente, una sardina capturada en diferente época (junio), talla y estado reproductor, presentando un total de ATP inicial (hipotético) de 5,95 $\mu\text{mol/g}$.

Existe un descenso aparente de nucleótidos en el músculo de sardina tras el lavado en la salmuera, esto es debido probablemente a fenómenos osmóticos, descenso que se agudiza durante los tratamientos térmicos de esterilización. Este descenso es de 1,70 y 0,99 $\mu\text{mol/g}$, para tratamientos térmicos de 115° y 120°C, respectivamente, valores similares a los estimados por pérdidas individuales de cada uno de los catabolitos del ATP durante el proceso de conservas, tal y como vimos en párrafos anteriores, es decir, se pierde un 25,7% y un 15% de catabolitos del ATP en el producto final.

El Valor K y el Valor K_i , son parámetros que evalúan la relación de las purinas, últimos catabolitos de la cadena bioquímica de degradación del ATP, con el total de ATP y sus catabolitos, caso del Valor K, o bien, con la suma de los últimos tres compuestos de la cadena de degradación, es decir, IMP, HxR y Hx para el caso del Valor K_i . El Valor K_i se aplica cuando el pescado a estudio posee una rápida degradación de los tres primeros componentes de la cadena degradativa, degradación que suele completarse en menos de 24 horas o sus niveles son muy bajos, a penas detectables según la especie (Hattula, 1997; Howgate, 2016).

En la Tabla 48, se exponen los resultados correspondientes al Valor K y el Valor K_i . La diferencia entre ambos valores a lo largo del proceso de elaboración de conservas es ligeramente superior en el Valor K_i , a penas un 1% respecto al Valor K durante las tres primeras fases, mientras que en los tratamientos de esterilización casi alcanza un 3%. Ambos parámetros son de amplio uso en pescado almacenado bajo refrigeración, incluso para pescado ahumado (Hattula y Kiesvaara, 1996; Hattula y col, 2001), cuya validez como parámetro de frescura es aceptada por diversos autores para especies como la sardina (Iida y col., 1982; Nolan y col., 1998; Gokodlu y col., 1998; Pacheco-Aguilar y col., 2000; Erkan y col., 2006; Schrubing y Meyer, 2006a; Erkan y col., 2008). Sin embargo, durante el proceso de elaboración de conservas, ambos valores sufren un incremento importante en el producto final con respecto al estado inicial de la materia prima empleada.

Tabla 48. Contenido total de catabolitos del ATP (Σ ATP, expresado en $\mu\text{mol/g}$) y Valor K y K_i (expresado como %) resultantes a lo largo del proceso de elaboración de sardina.

Fase del proceso	Σ ATP		Valor K	Valor K_i
	$\mu\text{mol/g}$	$\mu\text{mol/g.s.l.g.}$		
Fresco	6,62 ^a	33,25 ^a	23,31 ^a	24,40 ^a
Lavado	5,97 ^{a,d}	23,58 ^b	24,50 ^{a,b}	25,57 ^{a,b}
Cocción	6,17 ^a	23,76 ^b	26,27 ^b	27,81 ^b
CAN1	4,32 ^b	17,19 ^c	38,79 ^c	41,39 ^c
CAN2	5,52 ^c	22,15 ^b	37,41 ^c	39,98 ^c
CAN3	5,85 ^d	22,23 ^b	44,27 ^d	46,89 ^d
CAN4	5,40 ^c	18,87 ^c	49,11 ^e	52,02 ^e

Para cada columna, las medias con la misma letra en superíndice no indican diferencias significativas a un nivel del 5%.

Así, tanto el Valor K como el Valor K_i sufren un incremento significativo durante la fase de cocción, incremento que se acentúa tras la esterilización, mayor cuanto más agresivo es el tratamiento térmico. Las temperaturas usadas en el tratamiento térmico de pescado favorecen la degradación del ATP, niveles dependientes de la temperatura (Vilas y col., 2017).

En el caso de ahumado de salmónidos en caliente provocan cambios menos drásticos que en conserva, donde las temperaturas mínimas entre 61-70°C desnaturalizan las enzimas implicadas en la degradación del ATP, por lo que este incremento se asocia al calor, pero la secuencia de nucleótidos se mantienen en el posterior almacenamiento refrigerado de estas semiconservas (Hattula y col., 2001; Hattula y Kiesvaara, 1996). Por ello, algunos autores proponen el uso del Valor K como parámetro de control del proceso aplicado (Vázquez-Ortiz y col., 1997; Kuda y col., 2008; Rodríguez y col., 2009). Sin embargo, de acuerdo al trabajo de Veciana-Nogues y col. (1997b), estudiando la influencia de las diferentes etapas del proceso de conservas de *Thunnus albacares*, indican que IMP, HxR y Hx no aumentan o descienden por el tratamiento térmico, por lo cual los consideran adecuados como índices de calidad del producto final.

Pero al igual que ocurría al evaluar el comportamiento de las aminas volátiles y no volátiles, la pérdida acusada de agua así como la ganancia en grasa pueden alterar estos resultados y camuflar u ocultar

lo que realmente pasa. Así, estos valores se transforman y expresan en peso seco libre de grasa (Tabla 49).

En nuestro trabajo el valor inicial de Hx es de 2,81 $\mu\text{mol/g}$ peso seco libre de grasa, que fluctúa a lo largo del proceso de elaboración y entre los diferentes ensayos de esterilización, pero es la purina que más estable se presenta, independientemente de la fase de procesado.

Para solventar esta variabilidad, calculamos la relación de cada uno de los 5'-nucleótidos y purinas derivadas del ATP con la suma total de dichos catabolitos (Tabla 50).

Tabla 49. Contenido medio en 5'-nucleótidos y purinas derivadas del ATP a lo largo del proceso de elaboración de sardina.

FASE	CATABOLITOS DEL ATP*					
	5'-nucleótidos				Purinas	
	ATP	ADP	AMP	IMP	HxR	Hx
Fresco	0,03 ^a	1,16 ^a	0,30 ^a	24,02 ^a	4,95 ^a	2,81 ^a
Lavado	0,05 ^a	0,73 ^b	0,21 ^a	16,82 ^b	3,71 ^b	2,06 ^b
Cocción	0,13 ^b	0,12 ^c	0,70 ^b	16,21 ^b	3,94 ^{a,b}	2,30 ^{a,b}
CAN1	0	0	1,08 ^c	9,44 ^c	4,75 ^a	1,92 ^b
CAN2	0	0	1,42 ^d	12,45 ^d	5,71 ^c	2,57 ^a
CAN3	0	0	1,24 ^d	11,15 ^d	6,93 ^d	2,90 ^a
CAN4	0	0	1,06 ^c	8,56 ^c	6,84 ^d	2,41 ^a

(*) expresado en $\mu\text{mol/g}$ peso seco libre de grasa. Para cada columna, las medias con la misma letra en superíndice no indican diferencias significativas a un nivel del 5%.

En cuanto a la relación de éstos, el AMP sufre un ascenso significativo en la etapa de conservas, probablemente por la desaparición del ATP y ADP, por un lado, y por pérdida del IMP (ver datos en pslg) que balancea los valores finales. El IMP es el que sufre mayores pérdidas, posiblemente por un carácter más hidrosoluble y que se pierda con el agua de constitución tisular durante la esterilización, pérdida más significativa, superior al 20%, con tratamientos más drásticos (120°C). La HxR Manifiesta un aumento significativo en esta etapa, de apenas un 10% en los tratamientos más agresivos.

Tabla 50. Relación de 5'-nucleótidos y purinas derivadas del ATP a lo largo del proceso de elaboración de sardina.

FASE	CATABOLITOS DEL ATP*					
	5'-nucleótidos				Purinas	
	ATP	ADP	AMP	IMP	HxR	Hx
Fresco	0,08	3,48	0,89 ^a	72,24 ^a	14,86 ^a	8,45 ^a
Lavado	0,19	3,10	0,92 ^b	71,30 ^a	15,76 ^a	8,74 ^a
Cocción	0,55	2,00	2,98 ^b	68,20 ^a	16,57 ^a	9,70 ^b
CAN1	0	0	6,28 ^c	54,93 ^b	27,57 ^b	11,22 ^c
CAN2	0	0	6,41 ^c	56,17 ^b	25,78 ^b	11,63 ^c
CAN3	0	0	5,59 ^c	50,14 ^{c,b}	31,17 ^b	13,10 ^c
CAN4	0	0	5,60 ^c	45,29 ^c	36,25 ^c	12,86 ^c

(*) expresado en % respecto al contenido total de catabolitos del ATP. Para cada columna, las medias con la misma letra en superíndice no indican diferencias significativas a un nivel del 5%.

Observamos un incremento ligero ($p < 0,05$) del porcentaje de Hx (denominado Valor H por Luong y col., 1992; como $[(Hx \times 100)/(Hx + HxR + IMP)]$) desde la recepción de la materia prima hasta el producto final donde existen diferencias significativas respecto a la primera fase (4.3% para la esterilización a 120°C y 3.0 para 115°C). Entre los diferentes tratamientos de esterilización hay diferencias significativas, si bien, la media de Valor H a 120°C es ligeramente superior que a 115°C ($< 1.5\%$).

Otros autores (Gill y col., 1987; Shirai y col., 1988; Veciana y col., 1997b) encuentran que con tratamientos térmicos se incrementa ligeramente el contenido de Hx (si bien, no tienen en cuenta la pérdida de humedad de la materia prima). Dabidek (1972) postula que en medio ácido o neutro, con una cocción de 90°C, la Hx permanece estable, siempre y cuando los sistemas enzimáticos sean eliminados. Gallardo (1978), en su estudio de sardina, estima que el contenido de Hx no varía a lo largo del proceso, encontrando valores similares en la materia prima y en producto terminado.

En nuestra opinión, aunque se aprecian diferencias entre fases respecto a la relación de Hx, las diferencias a considerar son muy pequeñas, quizás debido a pérdidas de otros nucleótidos más polares lo que incrementa dicho porcentaje, por lo que el Valor H o % de Hx

podría ser considerado un parámetro de control del proceso según el estado inicial de la materia prima.

V. Resistencia térmica de *Clostridium botulinum* durante la esterilización. A continuación se exponen los resultados microbiológicos obtenidos para la materia prima utilizada (expresado en peso fresco, Tabla 51). Los valores indicados indican a nivel general, una tasa moderada, baja de bacterias aerobias mesófilos, entre las que se encuentran principalmente las bacterias autóctonas alterantes del pescado fresco como *Pseudomonas spp*, *Alteromonas spp*, ... que se desarrollan aún a temperaturas por debajo de +10°C (Chinivasagam y col., 1998; Gram y Huss, 1998; Gram y col., 2002; Ozogul y Ozogul, 2005; Josephson, 2017).

Continúan en importancia el grupo representado por las *Enterobacteriaceae*, entre las que se engloban especies patógenas para el hombre, como el grupo de Coliformes. Pero a pesar de que los indicadores de contaminación fecal (procedente de las vísceras de la propia sardina) mostrados en la tabla (*Salmonella spp*) se hallan por debajo de los límites de detección del procedimiento analítico, este supergrupo engloba a varias bacterias anaerobias, estrictas o facultativas, que en condiciones ambientales óptimas pueden transformar los aminoácidos en aminas biógenas, destacando según la bibliografía consultada los géneros *Enterobacter*, *Klebsiella* o *Proteus* (Guizani y col., 1999; Emborg y Dalgaard, 2008a; Emborg y Dalgaard, 2008b; Cheng y col., 2008; Gram, 2009; Hsu y col., 2009; Viscioano y col., 2012).

Pero en el caso concreto que nos atañe, y como posible riesgo biológico en productos en conservas, no se detectan bacterias anaerobias esporuladas, entre la que se incluiría *C. botulinum*. Es un hecho que habitualmente este grupo de microorganismos se halle a niveles no detectables en materias primas frescas, especialmente de la pesca extractiva. Por ello, se fuerza la situación inoculando una tasa elevada de esta bacteria, en concreto del tipo E, como la más adaptada a condiciones ambientales extremas, aguantando tasas de sal como las que se encuentra en el medio marino (<3% NaCl), con posibilidad de crecer a temperaturas bajas (> 4°C).

Tabla 51. Recuento bacteriano inicial de materia prima (n=5)

Análisis microbiológico	Resultado
Recuento de aerobios mesófilos	$2,3 \times 10^4$ ufc/g $1,2 \times 10^4$ ufc/g $2,7 \times 10^3$ ufc/g $6,0 \times 10^3$ ufc/g $4,5 \times 10^3$ ufc/g
Recuento de anaerobios sulfito-reductores	<10 ufc/g (para n=5)
Enterobacterias	$<1,0 \times 10^2$ ufc/g $2,1 \times 10^2$ ufc/g $1,6 \times 10^2$ ufc/g $<1,0 \times 10^2$ ufc/g $<1,0 \times 10^2$ ufc/g
<i>Salmonella spp</i>	Ausencia/25 g
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausencia/25 g

Tras el proceso de elaboración de conservas, se muestran los valores obtenidos respecto a la posible supervivencia de esporos y células germinadas de *Clostridium botulinum* tipo E inoculados (Tabla 52). Los parámetros técnicos de esterilización son los que habitualmente utiliza la Industria Conservera, variando entre los 110°C, buscando así una temperatura menos agresiva y tener un producto final, ligeramente más jugoso, o aplicar temperaturas más altas, 115°C, para garantizar una mayor inocuidad en contra de un producto de mayor calidad sensorial. En todo caso, se aplican tiempos mínimos en los que se pueden concurrir posibles riesgos orientados a

esta bacteria, que se valoran en función de su valor de letalidad (F_0), que se indican a continuación:

110°C 30 min, para F_0 de 1,18.
110°C 50 min; para F_0 de 2,90.
110°C 80 min; para F_0 de 6,44.
115°C 30 min; para F_0 de 4,32.
115°C 50 min, para F_0 de 9,17.
Control: sin tratamiento térmico.

En la

Imagen 142 se representa la evolución térmica en el autoclave, en condiciones suaves y máximas ensayadas (110°C 50 min y 115°C 50 min), la del punto frío del lote de sardinas esterilizado y su correspondiente valor F_0 .

A partir de la tasa inoculada por envase ($2,0 \times 10^7$ ufc/envase), en general se observa una reducción de 3 escala logarítmica en las conservas control (sin esterilizar). El resto de lotes, entre 110°C 30 min a 115°C 30 min, confirman que no hay supervivencia de esta bacteria.

Como era previsible en el lote control, no se detectan esporos de *C. botulinum*, pero sí es evidente la germinación de estos esporos como células vegetativas, pero a unos niveles más bajos a los inoculados (reducción de 3 escala logarítmica). Estos datos sugieren una mortandad de parte de los microorganismos, posiblemente por la presencia del oxígeno atmosférico durante la etapa de inoculación en los ejemplares de sardina, hasta su llenado y posterior cierre de la conserva. Es evidente que posteriormente las condiciones fueron propicias para la germinación de los esporos pero su desarrollo ha sido bajo por el almacenamiento refrigerado a 0/+2°C.

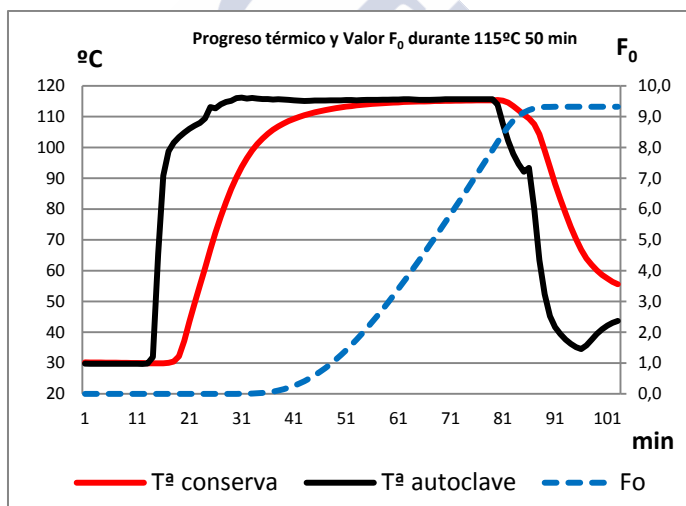
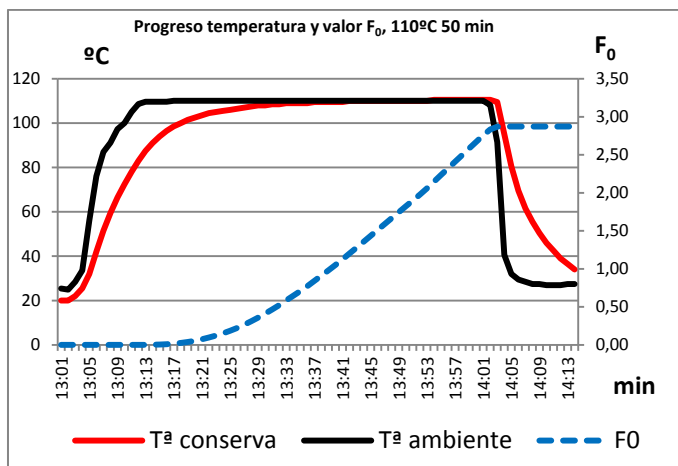


Imagen 142. Evolución térmica y Valor de letalidad (F_0) de las conservas de sardina elaboradas a 110°C durante 50 min (arriba) y 115°C 50 min (abajo).

En las muestras de conservas esterilizadas, la presencia y/o desarrollo de *C. botulinum* ha sido negativa tras una incubación de 48h a +37°C, y ausencia de esporos. Esto sugiere que los esporos pudiesen germinar al igual que el lote control en condiciones de anoxia, favorables, durante el periodo de espera hasta la etapa de esterilización (1 h), y condiciones mínimas de 110°C durante 30 min

han sido suficientes para eliminar esta cepa bacteriana, esto es, para un valor F_0 de 1,18 min.

Tabla 52. Recuento bacteriano tras proceso de esterilización (n=5)

Lote	A Esporos anaerobios	B Anaerobios sulfito-reductores
Control	<10	1,5×10 ⁴ 4,6×10 ⁴ 5,7×10 ⁴ 2,0×10 ⁴ 2,5×10 ⁴
110°C, 30 min	<10	<10
110°C, 50 min	<10	<10
110°C, 80 min	<10	<10
115°C, 30 min	<10	<10

Sin embargo, es importante tener en cuenta la flora inicial de la materia prima. Si bien, durante la cocción ya se elimina gran parte, y no es un hábito frecuente realizar este tipo de análisis en materia prima (por los excesivos tratamientos de esterilización aplicados posteriormente, así como por la propia naturaleza de la materia prima), pero la realidad de los escasos ensayos rutinarios de control, indican que es raro se den niveles de *C. botulinum* del orden como los aplicados en este ensayo. Pero no hay que bajar la guardia, ya que es importante tener en cuenta a otros posibles microorganismos de mayor carácter termoestable, aunque no sean tóxicos para el hombre, pero si pueden alterar el producto, especialmente del grupo o familia *Bacillaceae*. Por tanto, visto que al menos con la cepa de *C. botulinum* tipo E empleada, el éxito ha sido total, sería de interés realizar en un futuro ensayos en condiciones reales de proceso, con aquellos grupos de bacterias termoresistentes que tienen carácter alterante, como especies de *Geobacillus* o *Moorella* (André y col., 2013; Nakano, 2015; Berendsen y col., 2015).

En la Industria Conservera, este tipo de ensayos puede suponer un riesgo ante la posibilidad de cualquier fallo, ya sea en un ciclo de esterilización o bien que queden esporos en ambiente propicio por

falta de una higienización adecuada en la empresa, como resquicios, cintas de transporte, esquinas por donde pueda tocar el pescado, etc.

Es generalizado el temor de los responsables de Calidad o de Proceso de la Industria Conservera actual ante *Clostridium botulinum*, pero es evidente, y tras lo expuesto en la parte introductoria, que este temor viene desde los años 70 a raíz de las mal llamadas “conservas” de cangrejo azul en formatos grandes, cuando realmente son tratamientos de pasteurización, y por tanto, deben ser consideradas semiconservas. Pero el temor está ahí, y realizar este tipo de pruebas, ante un error, podría difundir el microorganismo por la planta de procesado.

Por ello, la Industria es reacia a este tipo de pruebas. Las grandes empresas suelen tener turnos de trabajo lo que significa que no existen paradas y la limpieza se suele hacer al final de la semana en el peor de los casos. Aún así, a escala laboratorio, son abundantes los trabajos con la especie no toxigénica, *Clostridium sporogenes* pero también más sensible que el *C. botulinum* tipo E. Si bien, de aplicarlo en la Industria y soportar algún fallo de proceso, este microorganismo se desarrollará provocando el abombamiento del envase, y así provocar pérdidas económicas. Por ello, la Industria aplica valores de letalidad altos, en torno a 10 o más, y así que prevalezca la seguridad alimentaria o calidad microbiológica ante la calidad sensorial.

Tras realizar un análisis sensorial de estas conservas con sus correspondientes tratamientos (obviamente en envases sin inocular), estos se reflejan en la siguiente tabla (Tabla 53), indicando en atributo que desmerece la calidad global, partiendo de la base que la materia prima era del mismo origen.

Tal y como se desprende de los valores expuestos en la tabla, la prueba menor valorada ha sido la que aplica el valor F_0 de 2,90, con una textura ligeramente jugosa, sabor suave a neutro, y columna blanda, quebradiza. Por tanto ya no adquiere tanta importancia el valor de letalidad en si, sino que es la combinación de éste con unas cualidades sensoriales aceptables, en este caso, con una temperatura suave de 110°C, durante 50 min.

Tabla 53. Valoración sensorial de conservas de sardina según tratamiento térmico.

	110°C			115°C	
	30 min	50 min	80 min	30 min	50 min
F₀	1,18	2,90	6,44	4,32	9,17
Valor Q	1,50	2,30	1,85	2,22	1,65
Atributo de demérito	Producto se valora el peor por tener la columna dura durante la masticación	Color crema suave	Textura ligeramente seca	Color crema	Textura seca y ligeramente dura; color crema ligeramente intenso

4.4.2. Experimento II. Comportamiento de los compuestos de degradación en sardina durante el almacenamiento refrigerado y la elaboración de conservas.

Los datos biométricos de la sardina capturada durante la campaña estival de 1995 y utilizada para la realización de este experimento se exponen en la Tabla 54. Se tomaron aleatoriamente de la caja los ejemplares correspondientes a 1 kg de peso, aproximadamente.

Tabla 54. Datos biométricos de la sardina capturada el 2 de Junio de 1995.

Ejemplar	Peso (g)	Tamaño (mm)	Sexo	Tamaño gónada (mm)
1	69,6	175	Macho	87
2	72,3	180	Hembra	74
3	73,6	174	Macho	67
4	60,5	176	Hembra	62
5	79,3	181	Macho	67
6	56,5	168	Macho	66
7	74,3	176	Hembra	45
8	62,7	171	Macho	73
9	80,1	178	Macho	74
10	78,9	182	Hembra	60
11	61,1	167	Macho	77
12	62,3	168	Macho	80
13	59,8	163	Macho	65
14	63,2	166	Macho	73
MEDIA	68,2±8,2	173,2±6,01		69,3±10,1

Tal y como se observa en esta tabla, el 28,6 % de los ejemplares capturados son hembras, cuyas gónadas presentaban huevos opacos y amarillentos, con tonos hacia el anaranjado. Los machos presentaban unas gónadas blanco-amarillentas, percibiéndose los folículos, con ausencia de esperma. En general, todos los individuos aún presentan cantidades importantes a simple vista de grasa en las vísceras. Por tanto, la sardina utilizada para este experimento se halla en un grado de madurez sexual correspondiente al estado de prefreza (Pascual y col, 1984), salvo el ejemplar 7, una hembra, que se encontraba en un periodo inmaduro.

Durante el desarrollo de este experimento, se estudió la formación de los compuestos de degradación habituales en los estudios de alteración de pescado refrigerado, como son BVT, OTMA, TMA,

TBA, catabolitos del ATP y aminas biógenas, así como su evolución y comportamiento durante el proceso de elaboración de conservas de sardina. Estos parámetros químicos son a su vez correlacionados con el análisis sensorial u organoléptico.

4.4.2.1. Análisis organoléptico

Durante el almacenamiento refrigerado con hielo de la sardina las muestras tomadas a día 0, tal y como cabría esperar, fueron evaluadas en todos sus atributos con el máximo valor (Rodríguez y col., 1991) que se corresponde con la Calidad Extra definida por el baremo del R.D 331/99 (derogado). El día 3, aunque las muestras son aceptables, las sardinas presentan ya indicios de rancidez para el olor en fresco, atributo que influye fuertemente en la caída del Valor Q o global (Tabla 55), haciendo que éste se sitúe un poco por encima del límite de rechazo a día 5, pero que a efectos prácticos se considera límite de aptitud sensorial o de rechazo.

El panel de catadores rechazó claramente el pescado el día 5 al presentar características de rancidez respecto al olor fresco, un aspecto externo pobre (pérdida de brillo y de escamas, opérculo rojizo), carne blanda, vísceras lisadas y agallas decoloradas (amarillo o pardo oscuro) y mucosas. Aunque en la evaluación del Valor Q no se contempla el examen cocido del músculo, éste manifestaba sensaciones desagradables durante la cocción (textura ligeramente seca, olor rancio y agrio, y sabor amargo). Estas sensaciones desagradables, tanto en fresco como en cocido, se incrementan en las sardinas evaluadas el día 7, día en que se dio por finalizado el experimento.

En la Tabla 56 se exponen los valores medios de las muestras de sardina en conserva elaboradas a partir de sardinas en hielo con distintos días de almacenamiento. Es de destacar que todas las muestras se presentaron a los catadores el mismo día que se realizó el examen sensorial, codificándolas de tal forma que no fuese posible conocer el día de envasado.

Tabla 55. Valor Q de la sardina fresca a lo largo del periodo de almacenamiento.

Días de almacenamiento	Valor Q
0	2,8±0,1
3	1,8±0,4
5	0,9±0,3
7	0,3±0,4

Examinando cada una de las características vemos como para el **color**, la puntuación más alta fue para las latas de día 0 (1,78), seguida de la de día 3 y día 5 (1,44 y 1,15; respectivamente), mientras que la puntuación más baja fue para las conservas elaboradas con sardinas de 7 días de almacenamiento (0,56). Respecto al **olor**, la máxima puntuación correspondió para las conservas realizadas a día 3 (2,31), seguido del día 5 y 0 (1,69 y 1,62, respectivamente). La más baja correspondió al día 7, con un valor de 0,75. Para el **sabor**, la máxima puntuación fue para las muestras envasadas el día 3 (2,44), seguida del día 0 (1,25) y del día 5 (1,12) obteniendo las envasadas el día 7 la puntuación más baja (0,56).

Tabla 56. Valores medios (\pm desviación estándar) obtenidos para cada atributo sensorial de conservas de sardina realizadas con materia prima con distintos días de almacenamiento.

Atributo	Tiempo de almacenamiento de la materia prima (días)			
	0	3	5	7
Color	1,78±0,91	1,44±0,63	1,15±0,64	0,56±0,63
Olor	1,62±0,52	2,31±0,70	1,69±0,8	0,75±0,71
Sabor	1,25±0,75	2,44±0,62	1,12±0,88	0,56±0,82
Textura	1±0,92	2,06±0,73	1,31±0,8	0,56±0,82
Valor Q	1,3±0,64	2,2±0,5	1,3±0,71	0,6±0,67

La **textura** alcanzó el valor más alto (2,06) en las muestras de conserva elaboradas el día 3, seguido del día 5 (1,31) y día 0 (1). Como en el resto de los atributos sensoriales, el valor de textura más bajo corresponde a las muestras de conservas elaboradas con sardinas de 7 días (0,56).

Como valoración global, teniendo en cuenta todos los atributos sensoriales (Valor Q), las conservas correspondientes a sardinas envasadas con 3 días de almacenamiento en hielo obtuvieron la

puntuación más alta, 2,2 (Clase II, Buena). Las conservas del día 1 y 5 alcanzaron la misma puntuación, 1,3 (Clase I, aceptable) y sólo la del día 7 obtuvo una puntuación menor de 1,25 (Inaceptable).

El hecho de encontrarnos la puntuación más alta en el color del músculo y la marca de la espina para el día 0 se corresponde con lo esperado, ya que la sardina se encontraba en rigor, estado óptimo de frescura y poseía los colores característicos de sardina fresca en lata, entre crema y blanco marfil, no teniendo lugar la lisis de vasos sanguíneos, riñón o la oxidación de la hemoglobina, que oscurecerían por zonas el músculo, y la zona inferior al peritoneo.

El día tres la puntuación descendió levemente ya que poseía un color ligeramente más oscuro. El proceso de oscurecimiento prosiguió, descendiendo por ello la puntuación en el día cinco y alcanzó el valor más bajo el día siete, donde se percibió tonalidad café con leche e incluso tonos rosados o rojizos, característicos de la sardina deteriorada.

Sin embargo, el olor alcanzó la puntuación más alta en las muestras de conservas realizadas con sardinas en hielo de 3 días (2,31), muestras que el panel de catadores reconoció como característico a *sardina en conserva*.

Por otro lado, los días 0 y 5 alcanzan una puntuación similar (1,62 y 1,69 respectivamente) debido a diferentes causas. Así, en las conservas correspondientes al día cinco el olor es débil a sardina y se notan indicios de rancidez, mientras que el día 0 el olor también es débil a *sardina en conserva* o poco específico (pescado “*ligeramente salado*”), pero no se perciben indicios de rancidez al estar la sardina fresca.

Las conservas correspondientes a sardinas envasadas con 7 días de almacenamiento en hielo, obtienen la puntuación más baja al detectarse claramente el deterioro de la materia prima empleada, manifestándose olores típicamente rancios y atípicos pero desagradables.

Al atributo del sabor le ocurre lo mismo que en el caso del olor. Así, las muestras correspondientes al día tres de almacenamiento, obtienen la puntuación más alta (2,44) percibiéndose un claro sabor a *sardina en conserva*. Las muestras de los días 0 y 5 consiguieron una

puntuación más baja pero similar; las muestras correspondientes al día 5 la sensación de sabor a *sardina en conserva* era débil y se detectaba rancidez mientras que las del día 0 el sabor también era débil a *sardina en conserva* pero no se percibió ningún indicio de rancidez al estar al sardina fresca empleada en un estado óptimo de frescura. Como era de esperar, las muestras de conservas de sardina con 7 días de almacenamiento en hielo obtuvieron la puntuación más baja al detectarse claramente sabores rancios y picantes, anormales en sardina en conserva, ya que la materia prima empleada se hallaba en un avanzado estado de deterioro.

Respecto a la textura, las muestras correspondientes a conservas con tres días de almacenamiento fueron de nuevo las que alcanzaron la máxima puntuación (2,06), aunque al igual que para el sabor, no fue la óptima al estar algo blanda. Las conservas elaboradas el día 5 presentaron una puntuación menor al detectarse una pérdida de la jugosidad. Las muestras de conserva del día 0 también mostraron una puntuación baja (1), esto puede ser debido al hecho de que la sardina estaba en rigor y primeras fases de postrigor cuando se enlató y esto pudo afectar a la textura, provocando un sensación más fibrosa o dura al masticar. Las muestras correspondientes al día 7, la puntuación volvió a ser la más baja, debido a que después del proceso de enlatado la sardina estaba muy seca por la lisis y desnaturalización proteica que implica una disminución de la capacidad de retención de agua de las proteínas.

El hecho de que la sardina en conserva del día tres alcanzase la puntuación más alta respecto al olor, sabor y textura, así como en el valor Q, frente a las muestras de conserva elaboradas el día 0, las cuales, en principio, fueron elaboradas con la sardina más fresca, fue debido a que el panel de cata de conservas de sardina están habituados al consumo de sardina comercial en este estado de frescura, es decir, el correspondiente a algunos días de almacenamiento refrigerado o en estado congelado, que probablemente dominen el mercado. De ahí los términos relativos a un claro sabor u olor a *sardina en conserva*, identificando las características organolépticas de la sardina envasada y esterilizada el día 0 como atípicas o poco características del producto, ya que los procesos iniciales de autólisis, y concretamente

los lipídicos, no han tenido lugar y no se han generado todavía compuestos de características fragantes o sápidas importantes.

También se observó que el aceite se oscureció paulatinamente en cada una de las conservas fabricadas por en esta tesis. El día cero presentaba el color típico del aceite de girasol, amarillo claro, adoptando una tonalidad de pardo claro a castaño oscuro a medida que las conservas contienen sardinas con mayor periodo de vida útil.

Esto nos indica que el color oscuro del aceite de las latas puede ser debido al estado de conservación de la materia prima empleada. Hay que tener en cuenta que también durante la fabricación comercial se reutiliza en cierto grado el aceite de rebose al llenarse las latas lo cual podría influir en un oscurecimiento de dicho aceite.

4.4.2.2. Composición

A continuación se describen los cambios que tienen lugar en la composición nutritiva elemental (humedad, grasa, proteína, cenizas) durante la elaboración de conservas a partir de materia prima con distintos días de almacenamiento y la evolución de éstos durante el periodo de almacenamiento de la sardina en hielo. El cambio proporcional de estos componentes se representa en la Tabla 57.

La tasa de **humedad** de la sardina fresca almacenada en hielo a día 0, 3, 5 y 7 se halla en torno al 70%, sin mostrar diferencias significativas entre los distintos días de almacenamiento ($p > 0,05$), es decir, el nivel acuoso se mantiene constante durante el almacenamiento refrigerado. Lo mismo ocurre para cada día respecto a la sardina en la fase de cocción (valor medio de 65,5%) y de esterilización (64,3%). El no encontrar variaciones en la misma fase, tanto en fresco, cocido como enlatado, para los días de toma de muestra podría resultar sorprendente para la fase de materia prima, ya que hubo pérdidas de agua tisular mientras se produjo el deterioro de la sardina, pero estas pérdidas parecen estar compensadas con la absorción de agua de fusión del hielo en el que se encontraban las sardinas.

Tabla 57. Composición elemental de sardina (expresado en %), según fase de proceso y día de realización de las conservas (n=5).

Fase ^a	día	Humedad	grasa	proteína	cenizas
1	0	70,37 ^a	7,24 ^a	20,83 ^a	1,56 ^a
	3	71,02 ^a	6,99 ^a	20,49 ^a	1,49 ^a
	5	69,79 ^a	7,81 ^a	20,96 ^a	1,44 ^a
	7	70,79 ^a	7,82 ^a	20,08 ^a	1,31 ^a
2	0	67,05 ^a	7,62 ^a	23,38 ^a	1,95 ^a
	3	64,50 ^a	7,39 ^a	25,21 ^a	2,90 ^a
	5	63,56 ^a	10,23 ^b	23,18 ^a	3,03 ^a
	7	67,11 ^a	6,78 ^a	23,19 ^a	2,92 ^a
3	0	64,46 ^a	7,88 ^a	22,02 ^a	2,24 ^a
	3	64,27 ^a	8,47 ^a	22,30 ^a	3,30 ^a
	5	64,10 ^a	9,24 ^{ab}	22,86 ^a	2,67 ^a
	7	64,30 ^a	9,59 ^b	22,45 ^a	3,06 ^a

(^a) donde 1 es la fase de materia prima fresca, 2 etapa de cocción y 3, etapa de esterilización. Diferente letra en superíndice en misma columna y por Fase, indican diferencias significativas (p<0,05)

En todos los casos, la tasa de humedad sufre un descenso gradual a lo largo del proceso de elaboración de conservas en todos los días en que se realizó dicho proceso, encontrándose diferencias significativas entre las fases de fresco y cocido, siendo los descensos del 3,32 %, 6,52 %, 6,23 %, 3,68 % para los experimentos realizados a día 0, 3, 5 y 7, respectivamente. Durante la esterilización apenas se observan variaciones significativas entre los distintos días de ensayo para esta fase, y no hay diferencias significativas con la fase anterior de cocción. Se observó que esta cantidad no varía durante la esterilización con respecto a la materia prima, siendo esta pérdida final del proceso y tras el periodo de maduración de 5,91%, 6,75%, 5,69% y 6,49% para los días 0, 3, 5 y 7, respectivamente.

La reducción de la tasa de agua durante la fase de cocción no es más que la consecuencia del tratamiento térmico de la materia prima, que precisamente va encaminada a reducir la actividad del agua del músculo y también evitar que se vierta al líquido de gobierno durante la esterilización. Pero en el fondo, no es más que el resultado de una

compensación con la tasa de grasa que gana en esta etapa, por infiltración muscular del aceite de girasol; en consecuencia, la tasa de humedad está afectada en mayor medida por el proceso térmico más agresivo de la esterilización, migrando el agua tisular al aceite de cobertura.

Por otro lado, durante el almacenamiento de la sardina en hielo, la tasa de materia grasa o **lípidos** ha permanecido constante. Respecto al proceso de conservas, el contenido de lípidos no muestra diferencias significativas entre las distintas fases del proceso para todos los días en que se realizaron las pruebas, aún a pesar de que la sardina estuviese inmersa en el aceite de la conserva por dos meses, ni siquiera el aumento observado tras la fase de esterilización de conservas para cada día (en torno al 1%) fue significativo. Es de resaltar que durante la cocción de la sardina, a parte de una pérdida importante del contenido acuoso, en el agua resultante de esta cocción se observaron gotas de grasa procedentes de los ejemplares. Destaca el día 5 sobre el resto de ensayos para la fase de cocción, donde se observa un valor significativamente alto, achacable a la heterogeneidad de alguna(s) de las muestras evaluadas para cada experimento (n=5, cada uno con un pool de 3-5 individuos).

Por tanto es evidente que también hay una pérdida respecto al contenido graso del músculo; sin embargo, al tratar estadísticamente los resultados la pérdida principal de agua y la ganancia en sales minerales compensa esta pérdida. El que tampoco durante la esterilización se produjese un aumento, podría ser explicado por la disposición subcutánea de la grasa del animal, que podría actuar como barrera ante la entrada de aceite que se usa como líquido de cobertura. El valor medio de la tasa grasa correspondiente a sardina fresca en hielo fue del 7,5 %, en cocido del 8 % y en conserva del 8,8 %.

Respecto a la tasa de **proteínas** para la sardina fresca almacenada en hielo, y al igual que ocurre con el resto de componentes nutricionales, no se observan diferencias significativas durante el periodo de anaquel. Lo mismo ocurre en la tasa obtenida en las fases de cocción y esterilización para cada día en que se realizaron los experimentos. Así, se obtiene un valor medio de proteína en sardina fresca de 17,3 %, del 19,5 % para la sardina cocida y del 22,40 % para

la sardina en conserva. Sin embargo, teniendo en cuenta el proceso de conserva para cada día sólo se observan diferencias significativas entre la fase de esterilización y el grupo de fase de materia prima y cocción.

La tendencia general es pues de un aumento ligero de la cantidad de proteína a lo largo de todo el proceso de esterilización. Este incremento desde la materia prima empleada al producto enlatado final varía desde un 18,6 % para el día 0 a un 32,1 % para el día 5.

También se observó un incremento progresivo del contenido proteico a medida que avanza el deterioro durante la elaboración de conservas. Para el día 0 aumentó en 18 %, el 3 un 30,1 %, el 5 un 32,1 % y para el 7 un 31,4 %, encontrándose una relación inversa con la humedad para estos mismos días. El aumento de la tasa de proteína a lo largo del proceso es reflejo de la pérdida de la capacidad de retención de agua de las proteínas a medida que se van desnaturalizando, que produciría un aumento en la concentración de esta proteína (Isidro 1993, Lupin y Trucco 1978), al seguir un patrón de comportamiento inverso al de la humedad.

En cuanto al contenido de sales minerales, o de **cenizas**, esta tasa aumenta durante el proceso de fabricación para todos los días en que se realizó la experiencia, siendo éste aumento progresivamente mayor a medida que avanza el deterioro (39,9 % el día 0, 107,7 % el día 3, 98,2 % el día 5 y 128,9 % el día 7). El mayor incremento en cenizas tuvo lugar entre la fase de materia prima y la de cocido; no se encontraron diferencias significativas entre las cantidades correspondientes a las fases de cocción y de esterilización.

Durante el almacenamiento en hielo, la cantidad de cenizas de la sardina fresca descendió gradualmente, un 16,6 % aproximadamente, a lo largo de los días. Este descenso fue más acusado a partir del día cinco. El progresivo descenso en la cantidad de cenizas durante el almacenamiento en hielo podría ser explicado por la pérdida de sales minerales y compuestos orgánicos en agua del exudado tisular, a medida que progresa el deterioro de la materia prima; debido a la alteración de las paredes celulares, las cuales pierden paulatinamente la capacidad de regulación osmótica y también sufren roturas, por lo

cuál se producen pérdidas del contenido celular, ayudado éste proceso por el lavado producido por la lixiviación del hielo.

Sin embargo, durante la etapa de cocción y de esterilización las cenizas se incrementaron a partir del día 3 en un 51,7 % y 34,1 %, respectivamente, manteniéndose constantes el resto de los días muestreados.

El aumento de la cantidad de cenizas a lo largo del proceso, se atribuyó a la entrada por ósmosis y fenómenos de difusión de sal en el músculo procedente de la salmuera antes de la cocción, por eso se mantuvieron estas cantidades durante la esterilización.

Durante la cocción aumentó para el día 3 y a partir de ahí se mantuvo constante para los diferentes días. Este aumento en la cantidad de cenizas durante la cocción podría ser explicado por el progresivo deterioro de la membrana celular lo que reduciría su capacidad de regulación de la presión osmótica, por lo cual entraría más sal procedente de la salmuera hacia las células musculares.

En la conserva se obtuvieron valores similares a la fase anterior para cada día de experiencia, es decir, a partir de la cocción el tratamiento térmico durante la esterilización no afecta al contenido de sales minerales del producto.

4.4.2.3. Parámetros de degradación

A continuación se describe y comenta como afecta el procesado de elaboración de conservas de sardina a los parámetros habitualmente utilizados como indicadores de frescura y/o alteración del pescado fresco, tanto los compuestos de naturaleza nitrogenada (BVT, aminos volátiles y no volátiles) como compuestos procedentes de la oxidación de la porción grasa (MDA o Índice de TBA) y de la degradación de 5'-nucleótidos de ATP.

A. AMINAS VOLÁTILES: Se exponen los resultados de aminos volátiles: BVT (como la tasa conjunta de TMA, DMA, MMA y principalmente NH_3), TMA y DMA, en la Tabla 58, expresadas en peso fresco. Tal y como se puede observar, las diferencias significativas en la evolución de estos parámetros a lo largo del periodo de almacenamiento refrigerado (Fase 1), se observan tanto

para la BVT como TMA de forma gradual hasta el final (día 7) y sólo a partir del día límite de aptitud sensorial o rechazo (día 5) para DMA esta tasa se estabiliza ($p>0,05$).

Tabla 58. Contenido en aminas volátiles durante las etapas de elaboración de conservas y según su grado de frescura (n=5).

Fase ^a	día	BVT*	TMA*	DMA*
1	1	11,32±1,04 ^a	0,11±0,04 ^a	0,06±0,01 ^a
	3	14,11±0,26 ^b	0,28±0,06 ^b	0,28±0,06 ^b
	5	14,38±0,73 ^{b,c}	0,74±0,13 ^c	0,61±0,21 ^c
	7	15,42±0,43 ^c	1,08±0,09 ^d	0,68±0,20 ^c
2	1	14,37±1,80 ^a	1,43±0,27 ^{ab}	0,73±0,37 ^a
	3	14,74±0,83 ^a	1,07±0,24 ^b	0,68±0,20 ^a
	5	14,60±1,13 ^a	1,62±0,19 ^a	1,81±0,65 ^b
	7	15,16±1,98 ^a	1,64±0,23 ^a	0,97±0,22 ^{ab}
3	1	38,66±1,55 ^a	8,67±1,52 ^a	2,17±1,36 ^a
	3	34,20±1,67 ^{ab}	8,58±0,84 ^a	1,43±0,76 ^a
	5	31,95±1,64 ^b	8,39±1,05 ^a	1,36±0,84 ^a
	7	32,27±2,51 ^b	7,93±0,76 ^a	1,65±0,12 ^a

(^a) donde 1 es la fase de materia prima fresca, 2 etapa de cocción y 3, etapa de esterilización. (*) mg N/100g, expresadas en peso fresco. Diferente letra en superíndice en misma columna y por Fase, indican diferencias significativas ($p<0,05$).

En la siguiente etapa de procesado, la cocción genera para cada día de ensayo una tasa similar de BVT respecto a la materia prima (etapa o fase anterior), sin mostrar diferencias significativas. Sin embargo, durante la etapa de esterilización, se genera más tasa de BVT, mostrando sólo diferencias en el primer día ($p<0,05$); y similar comportamiento se observa con la DMA.

Con TMA ocurre algo diferente, ya que en la fase de cocción se genera más TMA de forma significativa, con respecto a fase anterior, si bien con este tratamiento térmico no se aprecian diferencias a lo largo de los días de ensayo. Durante la fase de esterilización, la tasa de TMA que se almacena en la sardina en conserva se multiplica por 8,

sin apreciarse diferencias en esta fase a lo largo de los diferentes días de ensayo. Estos resultados expresados en peso fresco, ya sugieren que estos parámetros no son adecuados para evaluar la frescura de la materia prima.

Por ello, y poder confirmar definitivamente esta tesis de no ser parámetros adecuados, a partir de este momento se estudia de forma individual cada parámetro que integra las aminas volátiles de alteración, con los resultados expresados en peso seco libre de grasa (p.s.l.g), y así evitar las distorsiones en los resultados que podrían ocasionar las variaciones en la tasa de humedad y de grasa en para cada fase del proceso de elaboración de conservas (Besteiro y col., 1993; Rodríguez y col, 1996), pudiendo así estudiar si realmente hay pérdidas, generación o estabilización de determinados compuestos.

A.1- BASES VOLATILES TOTALES: Al estudiar el comportamiento de las **BVT** (Imagen 143) por fases en los diferentes días, nos encontramos una tendencia a aumentar a lo largo de los días de almacenamiento de la sardina en hielo (mp, de 38,40 a día 0 hasta 52,94 mg N/100 g p.s.l.g a día 7), aunque este incremento sólo es significativo entre el día 0 y los días posteriores.

La cantidad de BVT aumentó a lo largo del proceso en todos los días que se realizaron las experiencias. El incremento más importante tiene lugar el primer día de elaboración de conservas, pasando de una cantidad inicial en sardina en hielo de 50,66 mg N/100 g hasta alcanzar en la lata 139,78 mg N/100 g p.s.l.g.

No se observan diferencias significativas entre la fase de materia prima fresca y la fase de cocción para los días 0 y 7 pero si se manifiesta un descenso ($p < 0,05$) en la cantidad de BVT para los días 3 y 5, aunque la diferencia es muy pequeña. Así, y como pauta general, se produce un ligero descenso durante la cocción pasando de 63,42 mg N/100 g p.s.l.g. en sardina fresca de 3 días a 124,76 mg N/100 g p.s.l.g. en la cocción y de 64,75 a 119,92 mg N/100 g p.s.l.g. para la experiencia del día 5.

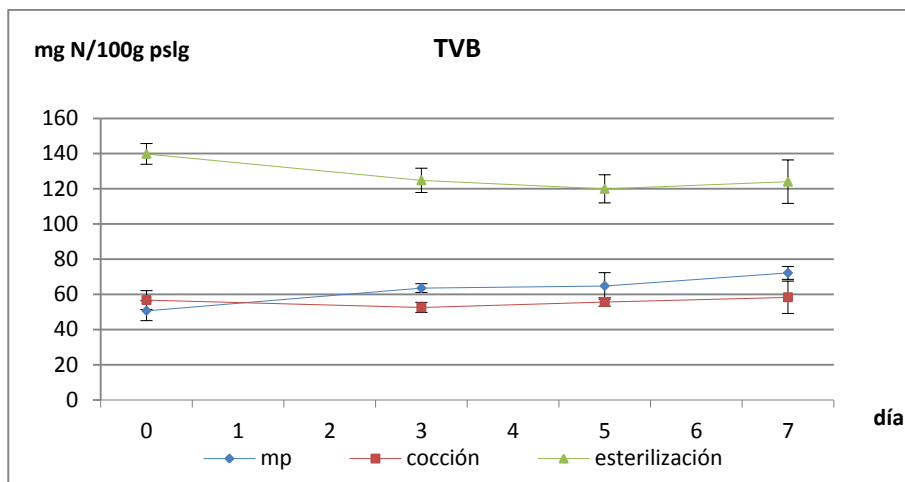


Imagen 143. Evolución de BVT durante la elaboración de conservas y grado de deterioro. Donde mp: materia prima o sardina fresca; cocción: etapa de cocción y esterilización.

Salvo el caso anterior, durante el procesado de sardina los días 3, 5 y 7 los valores de BVT fueron menores durante la fase de cocción respecto a la fase anterior, pero estas pérdidas de BVT sólo fueron significativas durante los días 3 y 5, posiblemente como consecuencia de la difusión de BVT en el agua de salmuera (tal y como se explicó en el capítulo anterior), arrastre por el agua de exudado tisular y volatilización del NH_3 , fundamentalmente.

No se encuentran diferencias significativas comparando los valores obtenidos durante la cocción de los distintos días aunque se observó una tendencia al aumento a lo largo de los días de toma de muestra (de 56,71 en el día 0 a 58,31 el día 7).

Sin embargo, para todos los días en que se realizaron las pruebas, las cantidades de BVT se incrementan ($p < 0,05$) durante la fase de esterilización, alcanzando valores superiores al doble al que se encontraban en las dos fases anteriores. Esto es debido a la degradación térmica más drástica que tiene lugar en esta fase, produciendo la desaminación de proteínas, algunos aminoácidos y otros compuestos nitrogenados como el OTMA que se degradaría a TMA y DMA (Tokunaga y col., 1975a; Gallardo y col., 1990). Esta

degradación ocurre en un compartimento estanco y no tienen lugar pérdidas por volatilización y arrastre como ocurriría en la fase de cocción. En la fase de esterilización se produce un descenso significativo a partir del tercer día al comparar entre sí las latas de los distintos días de ensayo. Así, BVT desciende desde 139,78 (día 0) a 124,76 mg N/100 g p.s.l.g. (día 3), manteniéndose estas cantidades sin diferencias significativas para el resto de los días muestreados.

Hay que señalar que las cantidades para sardina en hielo sin procesar, fueron inicialmente bajas para el primer día (50,66 mg N/100 g p.s.l.g. o 11,38 mg N/100 g peso fresco), indicando un elevado grado de frescura, puesto que aún estaba en *rigor mortis* cuando llegó al laboratorio. Sin embargo, los valores del último día (72,15 mg N/100 g p.s.l.g. ,o 15,46 mg N/100 g peso fresco) podrían ser considerados bajos para una materia prima con un grado de deterioro elevado (o grado organoléptico bajo), pero hay que tener en cuenta la pérdidas de BVT del músculo por lavado del agua de fusión del hielo durante el almacenamiento en cámara fría, que arrastraría los compuestos nitrogenados solubles en agua (NH_3 , TMA, etc) (Rodríguez y col., 1991).

La sardina tiene un valor alto de BVT y bajo de TMA en fresco (11,38 mg N/100 g y 0,11 mg N/100 g peso fresco, respectivamente) respecto a otra especies por lo cuál se deduce que son otros compuestos, como el amoníaco, los principales responsables de los altos valores de BVT.

Al considerar la influencia del proceso por días, el aumento ($p > 0,05$) observado durante la cocción para el día 0, fue debido posiblemente a que la sardina presentaba un elevado grado de frescura lo cual influiría en que las membranas celulares reducirían las pérdidas por difusión u ósmosis hacia la salmuera de lavado de los componentes nitrogenados de bajo peso molecular (creatina, creatinina, NH_3 , aminoácidos,..., Mathew y Raghunath, 1996; Lauzon y col., 2009; Jonsdottir y col., 2011). Después, durante la cocción, aún a pesar de la liberación del térmica del grupo amino de sus precursores (proteínas, aminoácidos, OTMA,...), la volatilización del NH_3 se vería dificultada por el pH bajo en que se hallaría el músculo y por el aporte de NH_3 a partir de compuestos nitrogenados de bajo peso molecular

como consecuencia de la acción térmica, compuestos todavía abundantes en el pescado fresco (Sakaguchi y col., 1982; Watabe y col., 1991; Imamura y col., 2012). Pero desde un punto de vista estadístico podemos afirmar que la cantidad de BVT se mantiene en las fases de materia prima fresca y cocción.

Como las bacterias y enzimas son destruidas (en su mayor parte por efecto de la cocción, la temperatura y tiempo de trabajo de todo el proceso no son suficientes para justificar el incremento vía biológica observado en la conserva final), la formación de BVT sólo puede ser atribuida a una degradación no enzimática causada por el tratamiento térmico (Gill y Thompson, 1984; Zhang y col., 2010; Zhu y col., 2012b).

El descenso observado en la cantidad de BVT de la conserva de los días 3, 5 y 7 respecto a la conserva del día 0 ($p < 0,05$) fue atribuido a las pérdidas previas de los componentes volátiles nitrogenados más livianos o de bajo peso molecular durante la fase de cocción al hallarse la sardina más degradada.

En cualquier caso, y de forma general, a pesar del aumento significativo de BVT en la materia prima, el incremento no tiene relación con el observado en la conserva, manteniéndose constante, salvo a día 0.

A.2– TRIMETILAMINA: Durante el almacenamiento refrigerado de la sardina se observó un aumento significativo de la cantidad de **TMA** para cada día, desde 0,50 mg N/100 g p.s.l.g. a día 0 (0,11 mg N/100 g peso fresco) hasta alcanzar 5,05 mg N/100 g p.s.l.g. el 7 (1,08 mg N/100 g peso fresco, Imagen 144).

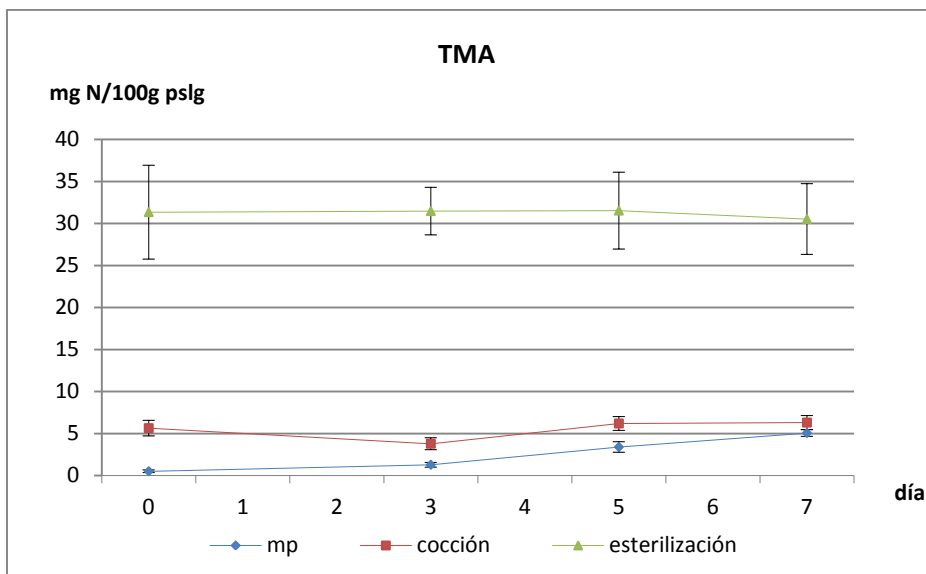


Imagen 144. Evolución de TMA durante la elaboración de conservas y en función del estado de frescura.

Por otro lado, durante el proceso de elaboración de conservas la formación de la TMA sigue una pauta similar para todos los días en que se realizaron las pruebas, es decir, se produjo un aumento gradual ($p < 0,05$) de la cantidad de TMA en cada fase a medida que transcurre el procesado del pescado. Durante la cocción se puede apreciar como la diferencia entre la fase de sardina fresca y de cocido se hace menor desde el primer día.

En el producto enlatado y esterilizado, el valor de TMA se dispara, alcanzando valores comprendidos entre 30,52 y 31,46 mg N/100 g p.s.l.g., no encontrando diferencias significativas entre los valores de TMA para los distintos días de experimentación, es decir, los valores de TMA se mantienen constantes en la conserva independientemente del estado de deterioro de la materia prima empleada. El valor medio de TMA de sardina en conserva para los 4 días de experimentación es de 31,2 mg N/100 g p.s.l.g.

El comportamiento de la TMA durante el proceso de conservas fue el esperado a partir de la degradación del OTMA observado para el primer día. La TMA inicial en la fase de materia prima (mp)

presenta valores bajos durante el primer día (0,50 mg N/100 g p.s.l.g.), un valor muy bajo de TMA respecto a otras especies (Erkan y Ozen, 2008; Ganeko y col., 2008; Gram, 2009; Simat y col., 2009; Howgate, 2010b; Toldrá y Reig, 2011). Este dato junto con el estado de "*rigor mortis*" en el momento de realizar las pruebas, indica que el tiempo transcurrido entre la captura y la recepción al laboratorio fue breve, es pues característico de una sardina muy fresca.

Los resultados de **OTMA** (Tabla 59), análisis realizado únicamente para el primer día (día 0), mostró un claro descenso significativo en cada una de los pasos seguidos durante el procesado de la sardina en conserva.

Tabla 59. Tasas iniciales de OTMA y TMA a día 0, expresado como mg N/100g de peso fresco (n=5).

Fase	OTMA	TMA
1	10,40±0,43 ^a	0,11±0,35 ^a
2	7,05±0,72 ^b	1,43±0,27 ^b
3	0,66±0,83 ^c	8,67±1,52 ^c

Diferente letra en superíndice en misma columna, indican diferencias significativas (p<0,05).

En la Tabla 60 se comparan los valores de TMA y OTMA correspondientes a cada fase de elaboración de conservas para el día 0 pero en peso seco libre de grasa. En principio, la suma de TMA y OTMA en sardina fresca nos da la cantidad inicial teórica de OTMA original (OTMA_t); esta operación es permisible para realizar comparaciones al estar ambos compuestos representados o expresados estequiométricamente (mg N o en moles). A parte de la diferencia observada entre ambos compuestos a medida que se incrementa la intensidad térmica, el OTMA_t desciende desde 46,43 mg N/100 g p.s. en sardina fresca hasta 2,37 en conserva, hay pues una pérdida considerable de Nitrógeno OTMA según el tratamiento térmico. La pérdida más importante ocurre entre la fase de fresco (materia prima, mp) y la fase de cocción (reducción del 39,8% inicial), mientras que entre la cocción y la esterilización hay una pérdida del 91,5% del OTMA restante (Imagen 145).

Tabla 60. Degradación del OTMA inicial durante el proceso de elaboración de conservas (día 0)(n=5).

FASE	OTMA ¹	TMA ¹	OTMat ¹
Sardina fresca	46,43 ^a	0,50 ^a	46,93 ^a
Cocción	27,97 ^b	5,64 ^b	33,60 ^b
Esterilización	2,37 ^c	31,34 ^c	33,71 ^b

¹, mg N/100 g p.s.l.g. Diferente letra en superíndice en misma columna, indican diferencias significativas (p<0,05).

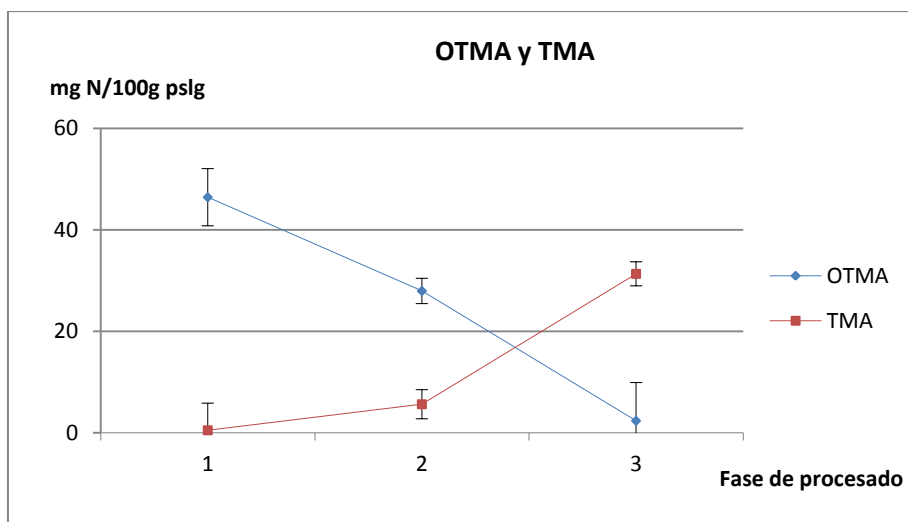


Imagen 145. Evolución de OTMA y TMA durante la elaboración de conservas a día 0.

Los valores bajos en la fase de enlatado, casi inapreciables, indican su casi total degradación debido al proceso térmico aplicado tanto durante la cocción como en la esterilización, ya que el corto tiempo transcurrido a temperatura ambiente durante el proceso de enlatado y la cocción previa no pueden explicar esta rápida degradación del OTMA por parte de los microorganismos. El calor produce una reducción del OTMA a TMA por vía no enzimática, catalizado por el ión Fe^{+2} , hemoglobina y cisteína (Castell y col, 1974; Jiangrong, 2010; Jacobsen y col., 2010). Consecuentemente se genera principalmente TMA. En cualquier caso, la etapa de

esterilización aplicada reduce prácticamente a 0 la tasa de OTMA presente en el músculo del pescado fresco.

El aumento progresivo ($p < 0,05$) de la TMA en la sardina conservada en hielo, muestra una degradación del OTMA por la actividad reductora de la flora microbiana. Este incremento fue muy lento al estar la sardina en hielo ya que por un lado la baja temperatura ralentiza la proliferación bacteriana con capacidad reductora del OTMA y por otro lado hay pérdidas por lavado de TMA y microorganismos a medida que el hielo se derrite.

Los valores ligeramente más altos ($p < 0,05$) de la TMA durante la cocción al vapor de la sardina comparados con los de sardina en hielo para todos los casos, son resultado de la degradación térmica de OTMA a TMA y DMA por vía no enzimática (Imagen 146). También hay que tener en cuenta las pérdidas que se producen por disolución en el exudado tisular durante la cocción y por la volatilización, que minimizan esta cantidad (Gallardo y col., 1990, Lauzon y col., 2009; Jonsdottir y col., 2011).

El que todos los valores de TMA en esta fase para los diferentes días de toma de muestras tiendan a ser similares, pudo ser debido a que para todas las muestras el proceso aplicado fue a la misma temperatura y durante el mismo tiempo.

También puede suceder una reducción no enzimática de OTMA y TMA a DMA (Tokunaga, 1975a, Gallardo y col., 1990; Rodriguez y col., 1997a). Aunque la producción esperada de DMA para sardina en hielo, con un grado de frescura alto, es insignificante (El Marrakchi y col., 1989), debido a que la DMA se produce por reducción enzimática autolítica a partir del OTMA y TMA, siendo mucho mayor esta actividad en pescado congelado (Rey-Mansilla, 2002), donde se inhibe el crecimiento bacteriano y en consecuencia su acción degradativa.

Debido al crecimiento de la flora bacteriana del pescado con actividad OTMA reductasa en el almacenamiento refrigerado (Howgate, 200), la formación de TMA es la vía degradativa principal del OTMA para la sardina mantenida en hielo (El Marrakchi y col., 1989; Ababouch y col., 1996). La cantidad de TMA alcanza valores

superiores a los de DMA en todos los pasos del proceso (Castell y col., 1974; Gallardo y col., 1990).

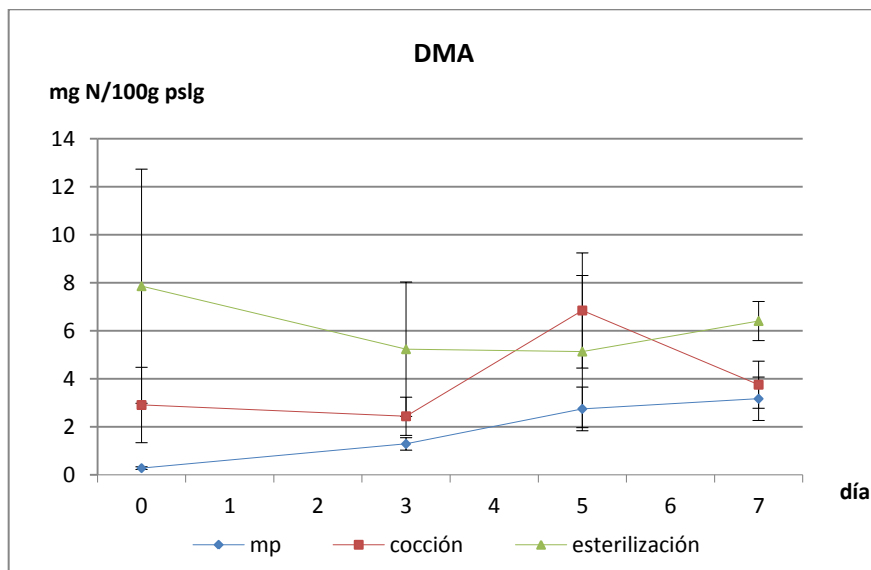


Imagen 146. Evolución de DMA durante la elaboración de conservas en función de su grado de frescura.

La DMA sería mayor en sardina congelada, donde se inhibe el crecimiento bacteriano y se permite la acción del enzima OTMA demetilasa, más un cofactor no proteico que resiste el frío y se inactiva por el calor (Valls y col., 1992).

Ya en producto esterilizado, los valores más elevados encontrados respecto a las fases anteriores indican que el proceso de esterilización tiende a reducir térmicamente por vía no enzimática casi todo el OTMA de la materia prima a TMA (y DMA), no encontrando diferencias significativas para esta fase entre los diferentes días.

En resumen, el incremento ($p < 0,05$) de la cantidad de TMA observado durante el proceso de transformación de 0,50 en la materia prima a 31,34 mg N/100 g. en la conserva para el primer día y de 5,05 a 30,52 mg N/100 g p.s.l.g. en el caso del día 7, se explica únicamente por el propio proceso térmico, el cual es más intenso y aplicado por mayor espacio de tiempo durante la fase de esterilización, a lo que

ayuda la estanqueidad del recipiente que evita pérdidas mayores por volatilización y exudado tisular desde la materia prima.

Jeya y col. (2005) evalúan la demora de 6 horas a 30°C en las fases de proceso de elaboración de conservas (materia prima, cocción y esterilización) de las especies *Katsuwonus pelamis*, *Scomberomorus commersonii* y *Sardinella gibbosa*. Existen unas pequeñas diferencias significativas para BVT, TMA e histamina entre materia prima fresca en hielo y tras 6 horas a 30°C, ésta última siempre mayor, y en los casos de tñidos, no existe una diferencia significativa entre las fases de materia prima y la siguiente de cocción, a excepción de la histamina, que sufre un importante descenso. La sardina posee una mayor diferencia tanto entre lotes de partida como durante la siguiente fase de cocción, donde se pierde parte de los compuestos mencionados. Durante la esterilización, BVT sube en las tres especies respecto a la fase anterior, la TMA aumenta ligeramente en el caso de las materias primas frescas y se mantiene cuando la materia prima se almacenó a 30°C, y en el caso de la Histamina, los niveles bajan ligeramente en el caso de *Scomberomorus* o se mantienen para *Katsuwonus*, pero con una bajada drástica en el caso de la sardina (50%).

Jeyasekaran y Saralaya (1991) indican que la sardina que es tratada con hielo tras la captura y con agua de mar refrigerada son aceptadas sensorialmente en 9 y 11 días respectivamente para su uso en conserva, mientras que la que sufre una demora en el tratamiento de frío su vida útil está en 6 días. Sin embargo, Losada y col. (2006) apoyan el uso de hielo líquido como tratamiento previo de refrigeración para usar sardina con 2% grasa (-1/-1,5°C, en 2 y 5 días) en conserva, en vez de usar hielo (+0,5/+1°C), ya que observan principalmente un descenso de la actividad oxidativa de los lípidos. Sensorialmente no se aprecian diferencias entre los 2 sistemas de enfriado (estudio de textura en conserva), aunque a nivel de BVT existe un ligero incremento no significativo cuando se emplea hielo líquido (55,1 mg N/100g) frente al tradicional (52,7 mg N/100g), pero inverso en el caso de la TMA, que aumenta ligeramente (no significativo) con el hielo tradicional, 8,2 mg N/100g (mayor desarrollo bacteriano). En ambos casos, no se aprecian diferencias

significativas entre día 0 y 5 más que en TMA cuando se usa hielo tradicional, pero achacable principalmente al proceso térmico, que degrada OTMA a TMA (pero no aportan datos de la materia prima de partida para cada día).

B - INDICE DE TBA: Además de los productos de degradación a los que hemos hecho referencia; a medida que avanza el estado de deterioro del pescado se produce al mismo tiempo la autooxidación de la fracción lipídica, importante en el caso de la sardina, formándose numerosos productos de degradación, entre ellos el malondialdehído (MDA) como producto mayoritario de esta oxidación (Aubourg y col., 2004). En la Tabla 61 Se exponen los resultados del Índice de TBA expresados en peso fresco, obtenidos durante este experimento, y en la Imagen 147 representados estos valores transformados a peso seco libre de grasa para eliminar las posibles interferencias de la fracción grasa y de humedad.

Tabla 61. Generación de MDA (mg MDA/kg peso fresco) en sardina según etapa de procesado y grado de frescura (n=5).

DIA	mp	Cocción	Esterilización
0	0,01 ^a	0,00 ^a	2,56±0,18 ^a
3	4,97±1,10 ^b	5,67±4,67 ^b	1,22±0,62 ^b
5	10,40±1,44 ^c	7,67±1,38 ^{b,c}	1,69±0,13 ^{b,c}
7	13,34±1,87 ^d	10,68±2,97 ^c	2,15±0,41 ^{a,b,c}

Al observar la evolución del índice del **TBA** o formación de MDA a lo largo del periodo de almacenamiento de la sardina en hielo, no se detectaron cantidades apreciables a día 0, tal y como cabría esperar de un producto de la pesca recién capturado. A partir de aquí y a medida que avanza el periodo de anaquel el índice de TBA se incrementa progresivamente ($p < 0,05$, a excepción de los días 5 y 7) para alcanzar 22,7; 47,4 y 62,3 mg MDA/kg p.s.l.g. el día 3, 5 y 7, respectivamente.

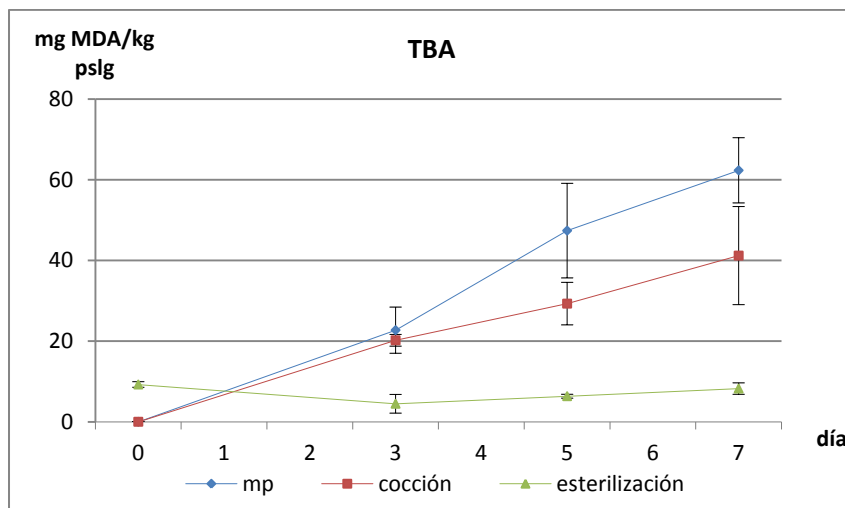


Imagen 147. Evolución de MDA durante la elaboración de conservas según grado de frescura..

Durante el proceso de elaboración de conservas, en general, se observa un descenso en el nivel de TBA en la fase de cocción, salvo en el caso del día 0 dónde no se detectan cantidades de MDA. A medida que se incrementa el tiempo de almacenamiento de la sardina fresca la diferencia de los valores medios entre la materia prima y la fase de cocción es mayor, aunque esta diferencia no es significativa.

Cuando se efectúa la esterilización, según el estado de frescura de la materia prima el comportamiento experimentado para este parámetro es distinto. Tras la esterilización en el día 0 se cuantifican 9,24 mg MDA/kg p.s.l.g., no detectándose cantidades apreciables en las dos fases anteriores, es decir, existe un incremento significativo cuando se trabaja con materia prima de grado de frescura máximo, aunque Slabyj y True (1978) indican que las etapas de salado incrementan la tasa de TBA, dependiente de la temperatura y concentración. También se genera una degradación de los fosfolípidos/ácidos grasos por efecto del calor; este hecho fue ya indicado por Selmi y Sadok (2007). Sin embargo, a medida que aumenta el periodo de anaquel de la sardina, se aprecia un descenso en la etapa de esterilización muy drástico ($p < 0,05$) respecto a las fases

anteriores (sardina fresca y cocción) para los días 3, 5 y 7 con 4,5; 6,3 y 8,2 mg MDA/kg p.s.l.g. en la conserva, respectivamente. Incluso se incrementa la diferencia de las cantidades encontradas entre la fase de esterilización y la fase previa de cocción a medida que se deteriora el pescado durante su almacenamiento. Es evidente que cuando el grado de frescura de la sardina descende, durante el proceso hay una pérdida muy importante de MDA.

El aumento de la cantidad de TBA mientras la sardina permanece en hielo fue debido a la autooxidación de la fracción lipídica, pero no se detectan indicios de rancidez el día 0 en la fase de materia prima ni tampoco en la cocción (dónde el tratamiento térmico podría inducir a una autooxidación; Yamamoto e Imose, 1989; Aubourg y col., 1995) debido al extremo grado de frescura en que se encontraba la sardina (aún manifestaba características de la rigidez cadavérica). Otros autores (Nunes y col., 1992; Pacheco-Aguilar y col., 2000; Kilinc y col., 2008; Mohan y col., 2012; Ozyurt y col., 2012) trabajando con especies grasas encuentran bajas cantidades de MDA al comienzo de los experimentos en condiciones de refrigeración; sin embargo, las condiciones previas de captura y tiempo hasta estas pruebas, o no se mencionan, o ya se encuentran en fases avanzadas de *postrigor mortis*. Rodríguez y col. (1991) encuentran para esta especie valores muy bajos al comienzo del experimento (0,23 mg MDA/kg peso fresco) y las sensaciones de rancidez son manifiestas en torno a valores superiores a 1,5 mg MDA/kg en peso fresco.

El descenso observado durante la cocción, a excepción del día 0, fue debido a la pérdida de líquido exudado del músculo como causa del tratamiento térmico, arrastrando parte del MDA ya que este es soluble en agua. Las condiciones de cocción (tiempo y temperatura) realizada durante el primer día (0) posiblemente no fuesen suficientes para generar cantidades detectables de MDA debido a la baja reactividad de los ácidos grasos poliinsaturados en condiciones de alto grado de frescura.

Tras la esterilización, las causas que provocaron valores más altos en el día 0 respecto a las fases previas del proceso fueron la oxidación por efecto del agresivo tratamiento térmico de la porción grasa durante un periodo de tiempo muy largo (Pigott y Tucker, 1980; Pigott y

Tucker, 1987) y la relativa capacidad de retención de agua por parte de las proteínas al estar éstas todavía relativamente intactas en su estructura secundaria debido al elevado grado de frescura (Duun y Rustad, 2007; Medina y col., 2009b; Sánchez-Zapata y col., 2011), como consecuencia de estos fenómenos se manifestaron mejor las oxidaciones térmicas en el músculo.

En los experimentos realizados los días siguientes, el comportamiento presentado por el Índice de TBA es el contrario al manifestado a día 0. En todos estos días (3, 5 y 7) el descenso significativo de las cantidades de MDA en la etapa de esterilización fue debido al tratamiento térmico que produjo una salida de agua tisular mucho más importante con malondialdehído disuelto hacia el líquido de cobertura, ya que las células y proteínas en general están parcialmente degradadas por la acción de proteasas tisulares y/o bacterianas (Makarios y Lee, 1993; Rodríguez y col., 2003) y como consecuencia estas proteínas poseen un grado de desnaturalización mayor a medida que aumenta el periodo de almacenamiento, perdiendo su capacidad de retención de agua y por tanto, indirectamente, aumenta la capacidad para retener el MDA (Alghazeer y col., 2008). A medida que las proteínas se desnaturalizan y pierden su capacidad de retención de agua, dependiendo de factores físicos (pH, temperatura, tiempo,...) y químicos (carga eléctrica de proteínas, estructura proteica, presencia de compuestos fuertemente reactivos,... Zheng y col., 2016) el MDA puede ligarse covalentemente a las proteínas (Bertrand y col., 2007; Song y col., 2014; Lv y col., 2014) y ser difícilmente recuperable cuando se realizan los extractos para su posterior análisis (Hui y col., 2012). Este fenómeno es uno más de los conocidos como Reacción de Maillard, afectando principalmente a la textura (e indirectamente al color), especialmente en alimentos con proteína miofibrilar en estado congelado (Zhang y col., 2005).

C- AMINAS BIOGENAS: A continuación, se analiza la formación de **aminas biógenas** durante el almacenamiento de la sardina en hielo y como afecta el procesado de conservas a éstas (Tabla 62), primero describiendo los resultados obtenidos para cada amina en particular y posteriormente se comentan estos resultados en

su globalidad. Las aminas estudiadas son putrescina (PUT), tiramina (TYR), Cadaverina (CAD), histamina (HIS), agmatina (AGM), β -feniletilamina (PHE), espermidina (SPN) y espermina (SPA).

Tabla 62. Contenido de aminas biógenas ($\mu\text{g/g}$) expresado en peso fresco, según etapa de proceso y día de almacenamiento (n=5)

Fase	día	PUT	TYR	CAD	AGM	HIS	PHE	SPN	SPA
1	0	0,56 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	3,62 ^a	6,90 ^a
	3	1,34 ^a	0,23 ^{ab}	0,12 ^a	0,32 ^a	0,00 ^a	0,13 ^{ab}	5,15 ^a	6,77 ^a
	5	1,99 ^{ab}	0,60 ^b	0,48 ^b	1,84 ^b	0,10 ^a	0,44 ^b	5,98 ^{ab}	7,39 ^a
	7	2,99 ^b	3,20 ^c	6,67 ^c	13,38 ^c	0,68 ^b	1,06 ^b	7,24 ^b	8,30 ^a
2	0	0,73 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	4,17 ^a	6,69 ^a
	3	1,18 ^a	0,00 ^a	0,02 ^a	0,09 ^a	0,00 ^a	0,09 ^b	4,86 ^a	6,71 ^a
	5	2,71 ^b	0,52 ^{ab}	0,16 ^a	0,59 ^{ab}	0,09 ^a	0,33 ^b	6,38 ^a	7,29 ^a
	7	2,83 ^b	1,88 ^b	3,11 ^b	5,73 ^b	0,17 ^a	0,26 ^b	6,40 ^a	6,89 ^a
3	0	0,51 ^a	0,00 ^a	0,02 ^a	0,07 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	2,44 ^a	4,05 ^a
	3	0,84 ^a	0,05 ^a	0,22 ^a	0,28 ^a	0,00 ^a	0,20 ^b	2,84 ^a	3,68 ^a
	5	2,42 ^b	0,37 ^a	0,57 ^b	1,03 ^b	0,39 ^{ab}	0,23 ^b	4,87 ^a	5,87 ^{ab}
	7	4,35 ^b	1,91 ^b	2,25 ^c	6,47 ^c	0,45 ^b	0,18 ^b	8,03 ^b	7,65 ^b

Diferente letra en superíndice en misma columna y por fase de procesado, indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En este caso, al cabo de 7 días de almacenamiento, la mayor tasa se genera con la Agmatina (13 $\mu\text{g/g}$), seguido de cadaverina (6,7 $\mu\text{g/g}$) y Espermidina (7,2 $\mu\text{g/g}$). La Espermina se mantiene estable y el resto de aminas se halla $\leq 3 \mu\text{g/g}$. En la etapa de cocción se observa una reducción ligera en las aminas, salvo para cadaverina y agmatina, que es más intensa, para mantenerse tras la fase de esterilización, aparentemente.

Como en casos anteriores, los datos se transforman y expresan en peso seco libre de grasa (p.s.l.g.), para descartar la humedad y grasa, magnificar los resultados (que han sido bajos durante los primeros días) y así poder verificar su posible estabilidad para ser considerados como parámetros de utilidad en conservas que evalúen la calidad de la

materia prima empleada. Dicha transformación de estos datos se reflejan en forma de gráficas.

C.1 – PUTRESCINA: Al observar la evolución de la **putrescina** (Imagen 148) a lo largo del periodo de almacenamiento en hielo, los valores de la putrescina se incrementan ($p < 0,05$), desde el día 0 con $2,51 \mu\text{g/g}$ hasta $13,96 \mu\text{g/g}$ p.s.l.g. el día 7.

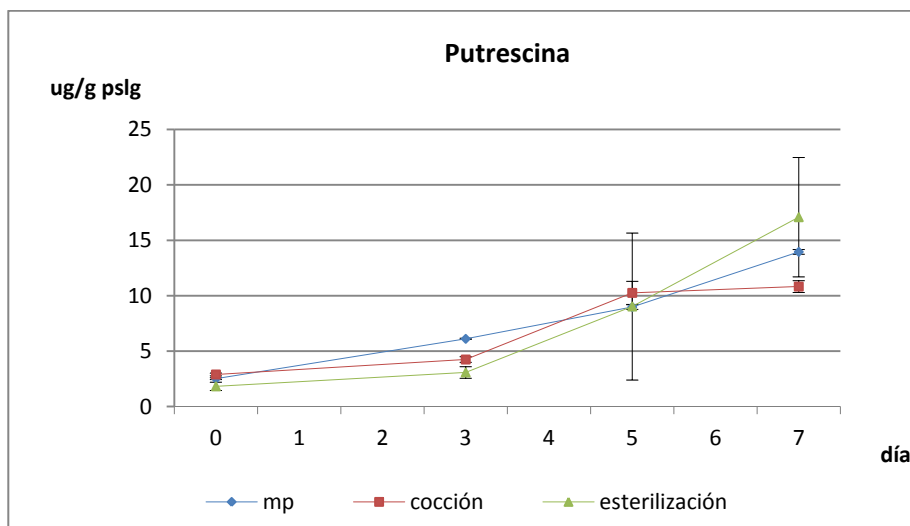


Imagen 148. Evolución de PUT durante la elaboración de conservas según grado de frescura.

Considerando el proceso de esterilización, la concentración de putrescina en los dos primeros días de muestreo (día 0 y 3) desciende ligeramente a lo largo del proceso, sobre todo en la fase de esterilización (de $2,5 \mu\text{g/g}$ en sardina fresca a $1,8 \mu\text{g/g}$ p.s.l.g. en conserva para el día 0 y de $6,1$ a $3,1 \mu\text{g/g}$ p.s.l.g. en el caso del día 3), aunque los tests estadísticos prácticamente no indican diferencias entre las distintas fases del proceso.

Sin embargo, las cantidades de putrescina de las diferentes fases para el día 5 tendieron a permanecer estables a lo largo del proceso sin variaciones significativas, mientras que para el día 7, el contenido de putrescina en la conserva es ligeramente superior ($p > 0,05$) al que

presenta la sardina fresca. En el límite de aptitud (día 5), la tasa de putrescina es de 2,0 $\mu\text{g/g}$ peso fresco (9,0 $\mu\text{g/g}$ pslg). Sims y col. (1992) encuentran una buena correlación sensorial con la presencia de esta amina en *Katsuwonus pelamis* en conserva.

C.2 – AGMATINA: Los valores de **agmatina** (Imagen 149) a día 0 se detectaron a nivel de trazas ($<0,05 \mu\text{g/g}$), únicamente en la conserva se cuantifican valores muy bajos (0,25 $\mu\text{g/g}$ p.s.l.g.).

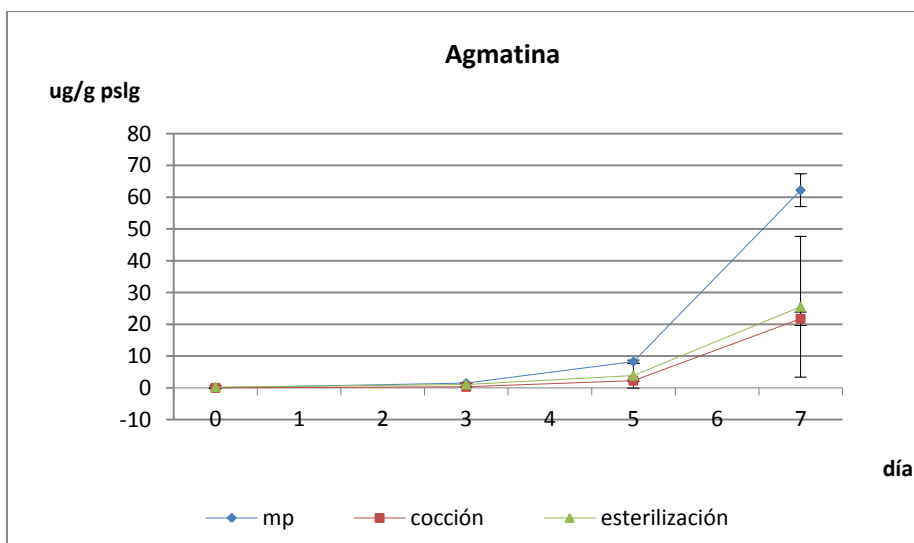


Imagen 149. Evolución de AGM durante la elaboración de conservas según grado de frescura.

En el día 3 se detectaron pequeñas cantidades de agmatina en todas las fases del proceso (1,48; 0,33 y 1,04 $\mu\text{g/g}$ p.s.l.g., para sardina fresca, cocida y en conserva, respectivamente), aunque las cantidades son muy pequeñas, sin apreciarse diferencias significativas entre las fases.

Para el día 5, la tasa en materia prima sufre un ligero aumento ($p<0,05$) en las (8,25 $\mu\text{g/g}$ p.s.l.g.) respecto al día tres, con una tendencia a disminuir en las etapas de cocido (2,25 $\mu\text{g/g}$ p.s.l.g.) y producto esterilizado (3,87 $\mu\text{g/g}$ p.s.), aunque las cantidades halladas

siguieron siendo tan pequeñas que prácticamente no se hallaron diferencias significativas entre estas fases de procesado. Esta misma pauta fue más clara para el día 7, al ser las cantidades mucho mayores ($p < 0,05$) respecto al día 5, con 62,21; 21,76 y 25,54 $\mu\text{g/g}$ p.s.l.g. en la materia prima, cocida y en conserva, respectivamente.

Analizando el comportamiento por fases en los diferentes días, se puede observar como se incrementaron gradualmente las cantidades a lo largo de los días de permanencia en hielo, desde 1,48 $\mu\text{g/g}$ para el día 3 hasta 62,21 $\mu\text{g/g}$ p.s.l.g. para el día 7, no encontrando cantidades detectables el primer día. Los valores para el día siete fueron notablemente mayores respecto a los de los días anteriores.

La misma evolución se mantuvo para la fase de cocción y enlatado, como reflejo de la evolución de la fase de materia prima (desde trazas a 21,76 $\mu\text{g/g}$ p.s.l.g. en cocido y 0,25 a 25,54 $\mu\text{g/g}$ p.s.l.g. en el producto esterilizado). En el día 7 las desviaciones típicas para cada fase fueron muy elevadas, indicando una gran variabilidad en la formación de la agmatina cuando la sardina está muy degradada. En el límite de aptitud sensorial (día 5), la agmatina en materia prima alcanza 1,8 $\mu\text{g/g}$ peso fresco (8,25 $\mu\text{g/g}$ pslg).

C.3 – CADAVERINA: En la Imagen 150 se muestra la evolución de la cadaverina expresada en p.s.l.g.

A pesar de ser uno de las principales aminas biógenas contempladas en la alteración del pescado refrigerado, en este caso su tasa se incrementa prácticamente a partir del día 5, en el límite de rechazo sensorial. A partir de entonces, el valor se incrementa significativamente en su almacenamiento en hielo (31,02 $\mu\text{g/g}$ pslg). Pero los tratamientos térmicos afectan a su tasa inicial, perdiéndose algo más de la mitad ya en la fase de cocción, para mantenerse en la fase de esterilización ($p > 0,05$). En el límite de aptitud sensorial (día 5), la cadaverina en materia prima alcanza 0,48 $\mu\text{g/g}$ peso fresco (2,21 $\mu\text{g/g}$ pslg). Sims y col. (1992) encuentran una buena correlación sensorial con la presencia de esta amina más putrescina en *Katsuwonus pelamis* en conserva, por lo que las proponen como indicadoras del grado de materia prima.

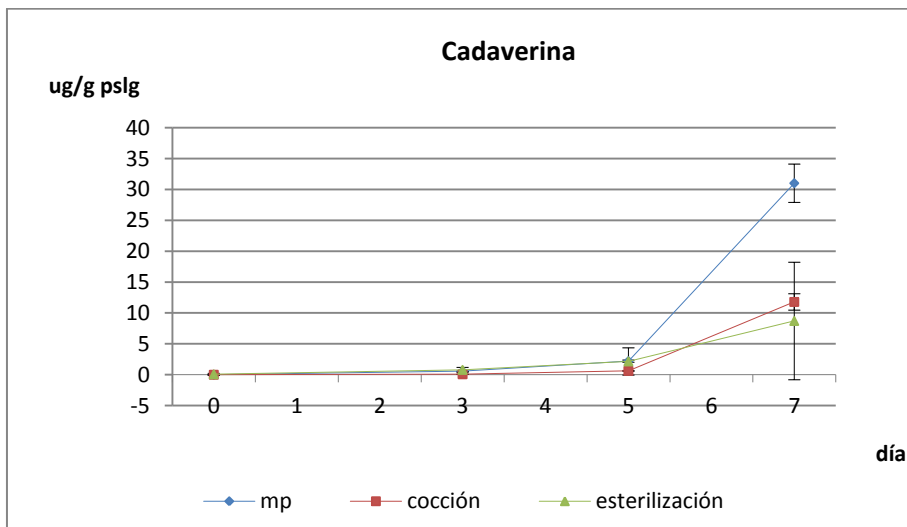


Imagen 150. Evolución de CAD durante la elaboración de conservas según grado de frescura.

C.4- HISTAMINA: No se detectó **histamina** (Imagen 151) los primeros días de realización de los ensayos (días 0 y 3). En el día cinco y siete se encontró en todas las fases del proceso, aunque en cantidades muy bajas para lo descrito en la bibliografía, nunca mayores de 4 $\mu\text{g/g p.s.l.g.}$ que sería la cantidad encontrada en la sardina almacenada con hielo el día 7 (Aknes y Brekken, 1988; Sims y col, 1992; Ababouch y col., 1996; Samaha y col., 1997; Ozogul y col., 2000; Rodríguez y col., 2005; Schubring y Meyer, 2006b; Ozyurt y col., 2012; Al-Jasser y Al-Jasass, 2014). En general, para los días 5 y 7 se observa una tendencia a disminuir durante la cocción y luego aumentar en la esterilización, pero las variaciones en las cantidades obtenidas fueron tan pequeñas que realmente no se encontraron diferencias entre las diferentes fases del proceso de elaboración de conservas para cada día, a excepción del día 7.

Las cantidades presentes en sardina fresca el día cinco (0,50 $\mu\text{g/g p.s.l.g.}$), muy bajas, aumentaron significativamente el día siete aunque también en pequeñas cantidades (3,21 $\mu\text{g/g p.s.l.g.}$). Durante la cocción se cuantificó 0,35 y 0,67 $\mu\text{g/g p.s.l.g.}$ para el día 5 y 7,

respectivamente, siendo cantidades muy pequeñas, cercanas al límite de detección. Por último, en la lata esterilizada, se obtuvieron cantidades de 1,45 y 1,77 $\mu\text{g/g}$ p.s.l.g. (día 5 y 7, respectivamente).

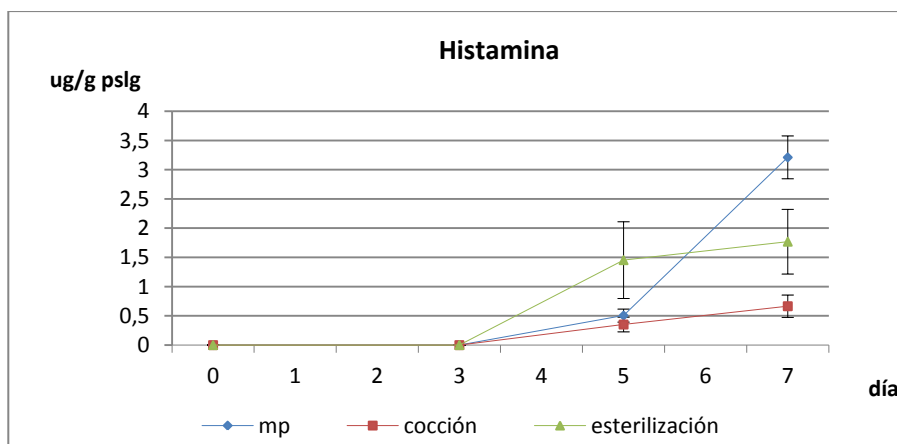


Imagen 151. Evolución de HIS durante la elaboración de conservas según grado de frescura.

C.5– TIRAMINA: La tiramina se manifiesta en cantidades modestas desde el día 3 (1,04 $\mu\text{g/g}$ p.s.l.g.) en la sardina refrigerada, para aumentar significativamente hasta el día 7 ($p < 0,05$), alcanzado los 14,92 $\mu\text{g/g}$ p.s.l.g. (Imagen 152)

Como ocurre con la cadaverina y agmatina, a mayor concentración de la materia prima, se corresponde con un incremento en la conserva en función del grado de frescura ($p > 0,05$), pero con el tratamiento térmico, su tasa se reduce un 50% ($p > 0,05$) para cada día de ensayo, manteniéndose en la conserva final. Así, para el límite de aptitud o rechazo sensorial (día 5), su valor en peso fresco de materia prima ronda los 0,6 $\mu\text{g/g}$ (2,7 $\mu\text{g/g}$ p.s.l.g.)

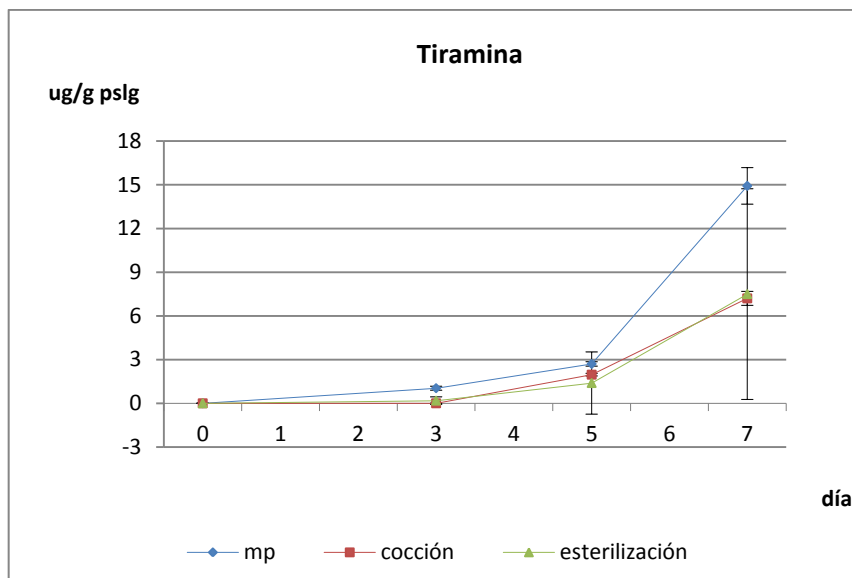


Imagen 152. Evolución de TYR durante la elaboración de conservas según grado de frescura.

C.6– ESPERMIDINA: La presencia de **espermidina** (Imagen 153) es manifiesta a día 0 con cantidades importantes en la sardina en hielo (16,15 $\mu\text{g/g}$ p.s.l.g.). Durante el periodo de vida útil de esta sardina en hielo, se produjo en la materia prima un aumento gradual ($p < 0,05$) en la concentración de espermidina desde el día cero al día 7 (esto es, hasta los 33,84 $\mu\text{g/g}$ p.s.l.g.).

Cuando se estudia el comportamiento de la espermidina durante el proceso de conservas, este comportamiento es distinto según el estado de la materia prima. Así, para el día 0 no hubo diferencias entre las dos primeras fases de proceso (fresco y cocción), descendiendo en torno a un 50% ($p < 0,05$) durante la esterilización (8,83 $\mu\text{g/g}$ p.s.l.g.). Durante el día 3, se observó un descenso gradual ($p < 0,05$) de las cantidades de espermidina en cada una de las fases de muestreo (23,47; 17,44 y 10,43 $\mu\text{g/g}$ p.s.l.g. para sardina fresca, cocida y en conserva, respectivamente). Para el día 5, prácticamente no existen diferencias significativas para todas las fases del proceso. Sin embargo, se aprecia una tendencia a un ligero descenso a medida que

avanza el proceso de elaboración de conservas (26,87 $\mu\text{g/g}$ en fresco, 24,29 en cocido y 18,24 $\mu\text{g/g}$ p.s.l.g. en la conserva). Para el día 7 no se encontraron diferencias significativas entre las tres fases, con 33,84 $\mu\text{g/g}$ p.s.l.g. en sardina en hielo y 31,33 $\mu\text{g/g}$ p.s.l.g. en conserva.

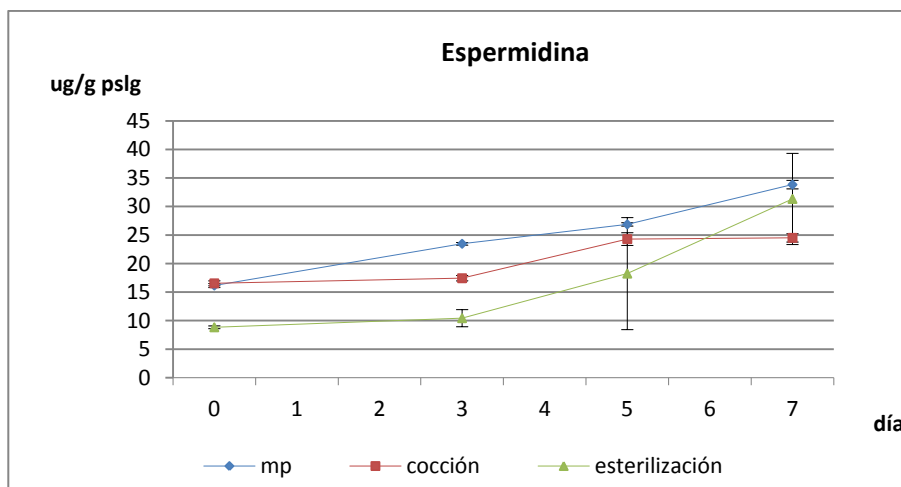


Imagen 153. Evolución de SPN durante la elaboración de conservas según grado de frescura.

En resumen, la espermidina en la sardina refrigerada aumenta ligera y proporcionalmente con el tiempo de almacenamiento. Cuando la materia prima es muy fresca, las pérdidas de espermidina durante el proceso de conservas es mayor que cuando el grado de frescura es menor. En cualquier caso, se observa un descenso de la tasa de espermidina desde materia prima hasta la conserva final, por lo que los tratamientos térmicos minimizan su contenido final.

C.7– ESPERMINA: La cantidad de **espermina** (Imagen 154), al igual que la putrescina y espermidina, aparece ya en el primer día, pero es con diferencia la amina más abundante, con una cantidad media de 30,77 $\mu\text{g/g}$ p.s.l.g. Durante el almacenamiento en hielo de la sardina y para todos los días de pruebas, se observa una tendencia al incremento con 38,82 $\mu\text{g/g}$ p.s.l.g. el día 7 ($p < 0,05$).

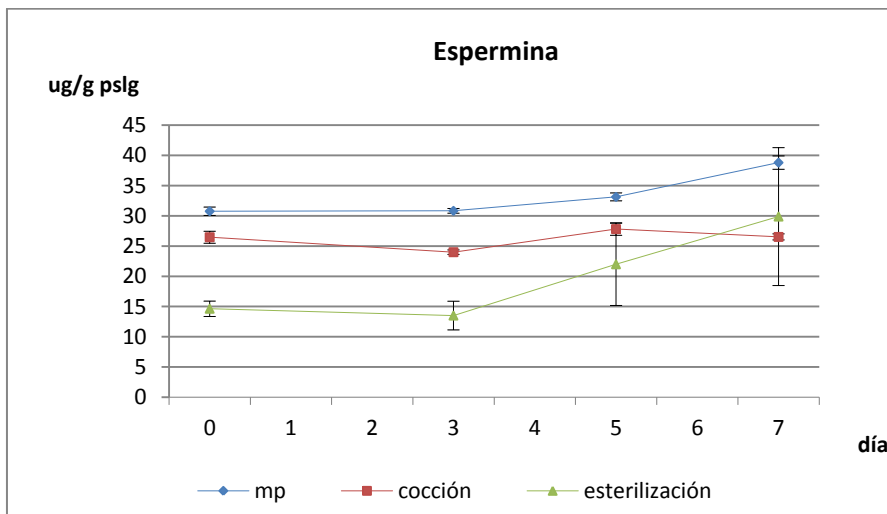


Imagen 154. Evolución de SPA durante la elaboración de conservas según grado de frescura.

Como en el caso de la espermidina, se observa para cada día de grado de frescura distinto, una disminución ($p < 0,05$) de esta amina en el músculo por efecto del tratamiento térmico, pero a partir del límite de rechazo sensorial (día 5), no se observan diferencias significativas entre la fase de cocción y esterilización, y ya en el día 7, esta diferencia sólo se manifiesta entre la etapa de materia prima y cocción, pero no se aprecian diferencias significativas entre producto final y resto de etapas.

En la conserva final se observó también un aumento de espermina a medida que el grado de frescura de la sardina es menor, aún a pesar de las pérdidas que tienen lugar durante la esterilización; así, desde los 14 $\mu\text{g/g p.s.l.g.}$ de los primeros días, la concentración media de la conserva a día 5 es de 22 $\mu\text{g/g p.s.l.g.}$ aumentando hasta los 30 $\mu\text{g/g p.s.l.g.}$ el día 7.

A la vista de los resultados obtenidos de aminas biógenas se confirma que la presencia de ciertas cantidades de putrescina, espermidina y espermina en el músculo de la sardina fresca (algunos de cuyos ejemplares manifestaban a día 0 características del fenómeno

de rigidez cadavérica o *rigor mortis*) son ya inherentes en el ejemplar vivo.

Los valores de la putrescina de sardina fresca obtenidos para el día cero fueron más bajos en un principio que los detectados por otros autores para esta especie (Abdalla y col., 1989; Mendes y col., 1991). La aparición de putrescina podría ser debido al tiempo transcurrido entre la captura y la adición de hielo o durante el tiempo transcurrido entre la captura y el momento de analizar la muestra; lo mismo podría aplicarse para el caso de la espermidina y espermina. Sin embargo, otros autores han citado la presencia de estas tres aminas en otras especies de peces *in vivo* (Yamanaka y col. 1989a; Rodríguez y col. 1999)

El incremento observado en las cantidades de todas las aminas a lo largo del periodo de almacenamiento de la sardina en hielo, más o menos destacable según la amina de que se trate, fue debido a la flora psicrófila que posee la sardina, que prolifera en gran medida en el músculo hacia el final de su permanencia en hielo, lo que produjo un aumento importante en la cantidad de aminoácidos libres por autólisis (sobre todo por parte de Catepsinas, Delbarrey y col., 2006; Márquez-Ríos, 2016) y por un aumento en la actividad proteolítica de las bacterias, al proliferar con gran rapidez (Akness y Brekken, 1998; Guizani y col., 2005). En el caso concreto de putrescina, espermidina y espermina, su generación en los primeros días puede ser autolítica (Yamanaka y col., 1986; Yamanaka y col., 1989a; Yamanaka y col., 1989b; Razaei y col., 2007; Zare y col., 2013) pero tras la invasión bacteriana, especies de los géneros *Morganella* y *Klebsiella* son capaces de generar estas aminas (Ozogul y Ozogul, 2007). Tras el tratamiento estadístico, los datos de esta tesis sugieren que la cantidad de espermina del presente experimento permanece prácticamente constante a lo largo del almacenamiento refrigerado.

Entre las aminas de carácter tóxico más importantes estudiadas (agmatina e histamina), sin duda alguna es la agmatina la amina que presenta una mayor tasa en relación al total de aminas estudiadas, pasando de aproximadamente 1,4 µg/g p.s.l.g. en el día 3 hasta alcanzar en algún caso 62 µg/g p.s.l.g. el día 7. Arena y Manca (2001) postulan la formación de agmatina a partir del aminoácido arginina

gracias a la presencia de *Lactobacillus*. Estos microorganismos son prácticamente psicrófilos y por tanto cabe esperar la formación de esta amina por parte de esta flora microbiana en las condiciones de baja temperatura que le impone el hielo como *Morganella* entre otras (Okuzumi y Awano, 1983; Makarios-Laham y Lee, 1993; Emborg y col., 2005; Emborg y Dalgaard, 2008a; Afsharmanesh y col., 2013). Se identifican las especies bacterianas generadoras de esta amina en la superficie del pescado, así como *Enterococcus*, *Psychrobacter* y *Micrococcus*, que durante el deterioro del músculo en refrigeración estas especies también llegan a ser predominantes en dicho músculo (Ozogul y Ozogul, 2007).

Por otra parte, la histamina presenta bajas cantidades y su generación hacia el final del almacenamiento es la más baja respecto al resto de aminas estudiadas. La histamina es la amina biógena establecida por la UE como de obligatorio análisis para esta especie de pescado así como otros de sus misma familia y del grupo de túnidos y escómbridos, dado su carácter termoestable, con un límite de 100 mg/kg. La ausencia o concentraciones inferiores a 50 mg/kg (que sería el nivel límite de EEUU) no implica necesariamente un buen grado de frescura, tal y como se ha demostrado en este trabajo, ya que estas concentraciones dependen de cantidad de histidina libre en el músculo, del nivel de microorganismos formadores de histamina (Wei y col., 1990), tratamiento a bordo y de las condiciones de almacenamiento (Tilve-Jar y col., 1996; Guizani y col., 2005; Sukkon y col., 2016; Verkhivker y Altman, 2018).

Las bacterias con capacidad histidin-descarboxilasa más importantes encontradas en el pescado son principalmente *Pseudomonas*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Shewanella* y bacterias mesófilas (Guizani y col., 1999; Emborg y Dalgaard, 2008a; Emborg y Dalgaard, 2008b; Cheng y col., 2008; Gram, 2009; Hsu y col., 2009; Viscioano y col., 2012), por tanto los resultados obtenidos en este trabajo concuerda con lo esperado, es decir, para sardina almacenada en hielo la flora formadora de histamina ve parcialmente inhibida su actividad, por lo cual no se esperan cantidades reseñables, al igual que ocurre con otras especies de pescado. Sin embargo, en muchas de estas especies de pescado la cantidad de histidina libre es baja con lo

cual la generación de histamina puede ser insignificante aún en condiciones óptimas para las bacterias; en el caso de la sardina el contenido del precursor de la histamina es alto (Ababouch y col., 1991).

En cuanto al proceso de elaboración de conservas, en general, se observó una pérdida de aminas durante el proceso, algo que ya observaron para túnidos Sims y col. (1992). Estas pérdidas de las cantidades de aminas en el músculo en las fases de cocción y esterilización fueron debidas al arrastre por dilución de las aminas en el agua exudada durante la cocción y en el líquido de gobierno de la conserva (Rodríguez y col., 1997). Durante la cocción, la caída en la cantidad de aminas es muy baja, casi insignificante en la mayoría de los casos y sobre todo durante los primeros días posiblemente debido a que la sardina estaba muy fresca y el músculo firme con las células sin alterar. Al estar todavía en estado de *rigor*, no habría comenzado la degradación bacteriana y la actividad enzimática degradativa sería incipiente, por lo que no se producirían grandes pérdidas por dilución en el agua de cocción al estar las paredes celulares intactas.

Sin embargo, durante la esterilización, dónde se aplica un tratamiento térmico más agresivo y por más tiempo, la pérdida de aminas es también patente, siendo más importante en el caso de la espermidina y espermina durante las pruebas realizadas a día 0 y 3, curiosamente cuando la sardina está más fresca. Cabría esperar una mayor pérdida durante los días posteriores cuando el tejido muscular está más alterado. La explicación puede venir dada por una ligazón de estas aminas con otras estructuras reactivas, producto de la degradación, de mayor peso molecular, que retendrían estas aminas.

En el caso de túnidos en conserva, la SPA y SPA son los más abundantes y sufren un descenso en la conserva desde materias primas (Veciana y col., 1997a), permaneciendo constante la media del resto de parámetros (no se tiene en cuenta la pérdida de humedad y ganancia de grasa). Estos autores postulan la estabilidad térmica de la histamina para sostener dicha estabilidad a lo largo del tratamiento térmico, al igual que Frank y col. (1981). A pesar de ello, y para un mismo experimento, una lata mostró un máximo de 40 ppm de histamina, y en algún caso alguna otra amina como CAD o AGM,

pero puntuales, lo cual indica una amplia variedad de grado de frescura. Así mismo, indican que la IMP ratio permanece constante, proponiéndolas como indicador de alteración, pero sin relacionarlo con el análisis sensorial o estableciendo límites.

Pacheco y col (1998) evalúan los contenidos de histamina en conservas de sardina (*Sardinops sagax*), almacenada en hielo (0°C) y hasta 15 días. El pH fluctúan entre 5,7 a 6,1, bajo, y la formación de histamina es nula (máximo de 7 mg/100g), lo cual muestra que depende de la temperatura, que según Rodríguez-Jeréz y col. (1994a y 199b), se produce gracias a las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, cuyo óptimo de temperatura está entre 20-30°C (Hwang y col., 1995) y pH 6.5 (Eitenmiller y col, 1981). La histamina, la única amina biógena de regulación sanitaria (límite de 100 ppm, UE), se ha encontrado en altas concentraciones en marcas de conserva de zonas locales, de países poco desarrollados (Samaha y col., 1997), donde los sistemas de refrigeración de la flota son inadecuados o inexistentes (temperaturas ambiente de 30°C; Wootton y col., 1989), pero que gracias al tratamiento térmico de esterilización, afecta al contenido inicial favoreciendo un descenso significativo en diferentes especies como *Sardinella gibbosa*, *Katsuwonus pelamis* y *Scomberomorus commersonii* (Shakila y col., 2005).

En condiciones ambientales postcaptura moderadas o abusivas (30°C), la formación de aminas volátiles y biógenas, principalmente histamina, son altas en determinadas especies a las pocas horas (principalmente carángidos, clupeidos y escómbridos), rechazados sensorialmente en torno a las 12 horas, no apreciando correlación alguna entre esta amina y las volátiles (Shakila y col., 2003). Algunos autores han estimado que tasas entre 20 y 100 ppm de histamina son potencialmente tóxicas (Lehane y Olley, 2000), pudiendo manifestar cuadros clínicos (diarreas, vómitos, urticaria, ...) a las pocas horas, si bien, es patente que existen sustancias sinérgicas que potencien su efecto a bajas concentraciones (Clifford y col., 1989).

Proteus morganii es uno de los microorganismos implicado en la formación de histamina a temperaturas moderadas (Eitenmiller y col, 1981) y un clásico de las citas bibliográficas (Taylor y col., 1986; Yoshinaga y Frank, 1982; Lehane y Olley, 2000). Sin embargo,

existen otras especies bacterianas pueden formar cantidades importantes de histamina en condiciones de refrigeración como *Photobacterium iliopiscarium* y *P. phosphoreum* (Torido y col., 2012) pudiendo alcanzar las 500 ppm de histamina a 4°C al 5° día, con un mayor desarrollo en *P. iliopiscarium*, y a medida que se incrementa la temperatura (10 y 15°C), aumenta la tasa para formar 200 ppm en 3 días y alrededor de 30 horas a 15°C, pero a medida que aumenta la temperatura, la formación de histamina es mayor por parte de *P. phosphoreum*. Así, un lote de caballa en conserva de Taiwan que produjeron víctimas de histaminosis, mostraban cantidades de histamina superiores a las 60 ppm, siendo el resto de aminas inferior a las 10 ppm (Tsai y col., 2005). Se estima en torno a un 74% de la flora bacteriana que puede formar aminas biógenas cuando el pescado está conservado en hielo, siendo las más importantes *Shewanella*, *Pseudomonas*, y Gram+: *Phosphobacterium*, *Aeromonas* y *Micrococcus*, generando Putrescina y Cadaverina principalmente (Lakshamanan y col., 2002).

D- CATABOLITOS DEL ATP.: Las conservas se realizaron con la materia prima que evaluaba el panel de catadores. Así, las muestras del día 0 fueron clasificadas como de Calidad Extra; las del día 3 como Categoría C, mientras que las sardinas del día 5 fueron rechazadas debido a su textura blanda y olor rancio, características que se acentúan junto con otros atributos desagradables el día 7.

En la Tabla 63 y Tabla 64 se exponen los resultados de los catabolitos del ATP durante el proceso de conservas para cada día de estudio, expresado en peso fresco y en peso seco libre de grasa, respectivamente. Los datos se expresan en $\mu\text{mol/g}$ en peso seco libre de grasa (pslg) para evitar las distorsiones creadas por el contenido de agua y grasa, componentes que varían significativamente entre fases del proceso (Besteiro y col, 1993; Rodríguez y col, 1997). El ATP y ADP no serán comentados o representados en adelante pues su concentración es muy baja desde el primer día (a nivel de trazas) y desaparecen tras la esterilización.

En general, se observa que el contenido de IMP desciende significativamente ($p<0,05$) en el producto enlatado; la HxR e Hx se mantienen salvo la HxR en el día 0 que se incrementa significativamente ($p<0,05$). Sólo el AMP aumenta significativamente ($p<0,05$) en la conserva, a expensas de ATP y ADP.

Atendiendo a cómo se expresen los resultados, la bajada de IMP de materia prima a la fase de cocción, no indican diferencias significativas (salvo el día 5), pero cuando se tiene en cuenta la pérdida de agua y grasa (o ganancia de ésta tras la esterilización), estas diferencias entre materia prima y cocida son patentes en los días críticos de la limitación de frescura de la sardina (días 3 y 5).

Tabla 63. Contenido de purinas y 5'-nucleótidos derivados de ATP durante el almacenamiento de sardina fresca y desarrollo de proceso de conservas (expresado como $\mu\text{mol/g}$ peso fresco).

Día	fase	ATP	ADP	AMP	IMP	HxR	Hx	ΣATPs
0	1	0,23 ^a	0,21 ^a	0,15 ^a	4,79 ^a	0,50 ^a	0,27 ^a	5,95 ^a
	2	0,05 ^b	0,14 ^b	0,24 ^b	4,75 ^a	0,67 ^{ab}	0,20 ^b	6,05 ^a
	3	0,00 ^c	0,00 ^c	0,57 ^c	3,88 ^b	1,31 ^b	0,25 ^a	6,01 ^a
3	1	0,01 ^a	0,22 ^a	0,04 ^a	4,19 ^a	1,26 ^a	0,28 ^a	5,99 ^a
	2	0,02 ^a	0,09 ^b	0,15 ^b	3,75 ^a	1,35 ^a	0,15 ^b	5,50 ^a
	3	0,00 ^a	0,00 ^c	0,22 ^b	2,31 ^b	1,23 ^a	0,25 ^a	4,01 ^b
5	1	0,00 ^a	0,21 ^a	0,01 ^a	3,46 ^a	1,75 ^a	0,46 ^a	5,90 ^a
	2	0,01 ^a	0,06 ^b	0,13 ^b	3,06 ^b	1,44 ^b	0,30 ^b	5,00 ^b
	3	0,00 ^a	0,00 ^c	0,14 ^b	1,94 ^c	1,51 ^{ab}	0,41 ^c	4,00 ^c
7	1	0,00 ^a	0,16 ^a	0,02 ^a	2,49 ^a	1,63 ^a	0,49 ^a	4,80 ^a
	2	0,00 ^a	0,07 ^b	0,12 ^b	2,64 ^a	1,72 ^a	0,43 ^b	4,98 ^a
	3	0,00 ^a	0,00 ^c	0,17 ^b	1,43 ^b	1,31 ^b	0,51 ^a	3,42 ^b

(*) Fase: 1 materia prima fresca, 2 etapa cocción, 3 esterilización. Diferente letra en superíndice en misma columna y por Día, indican diferencias significativas entre fases ($p<0,05$).

Tabla 64. Contenido de purinas y 5´-nucleótidos derivados de ATP durante el almacenamiento de sardina fresca y desarrollo de proceso de conservas (expresado como $\mu\text{mol/g}$ pslg).

Día	Fase*	ATP	ADP	AMP	IMP	HxR	Hx	ΣATPs
0	1	1,01 ^a	0,95 ^a	0,67 ^a	21,38 ^a	2,25 ^a	1,21 ^a	27,47 ^a
	2	0,19 ^b	0,56 ^b	0,96 ^b	18,74 ^a	2,64 ^b	0,79 ^b	23,88 ^b
	3	0,00 ^c	0,00 ^c	2,05 ^c	14,03 ^b	4,72 ^a	0,92 ^{ab}	21,72 ^b
3	1	0,04 ^a	0,98 ^a	0,19 ^a	19,05 ^a	5,72 ^a	1,27 ^a	27,25 ^a
	2	0,06 ^a	0,30 ^b	0,53 ^b	13,32 ^b	4,82 ^b	0,52 ^b	19,55 ^b
	3	0,00 ^b	0,00 ^c	0,82 ^c	8,48 ^c	4,52 ^b	0,90 ^{ab}	14,72 ^b
5	1	0,01 ^a	0,96 ^a	0,07 ^a	15,44 ^a	7,81 ^a	2,07 ^a	26,35 ^a
	2	0,04 ^b	0,24 ^b	0,48 ^b	11,67 ^b	5,48 ^b	1,14 ^b	19,06 ^b
	3	0,00 ^a	0,00 ^c	0,51 ^b	7,28 ^c	5,66 ^b	1,54 ^{ab}	14,99 ^b
7	1	0,00 ^a	0,77 ^a	0,09 ^a	11,66 ^a	7,62 ^a	2,30 ^a	22,43 ^a
	2	0,00 ^a	0,27 ^b	0,47 ^b	10,13 ^a	6,57 ^{ab}	1,63 ^b	19,08 ^b
	3	0,00 ^a	0,00 ^c	0,65 ^b	5,48 ^b	5,02 ^b	1,95 ^{ab}	13,11 ^c

(*) Fase: 1 materia prima fresca, 2 etapa cocción, 3 esterilización. Diferente letra en superíndice en misma columna y por Día, indican diferencias significativas entre fases ($p < 0,05$).

En la Imagen 155, se representa la suma total de los 5´-nucleótidos y purinas de degradación del ATP, expresado como pslg. Durante el almacenamiento refrigerado de la sardina no se aprecian diferencias significativas ($p > 0,05$) en el contenido total de los productos de degradación del ATP aunque tienden a disminuir el séptimo día. Sin embargo, en el producto enlatado existe una pérdida significativa ($p < 0,05$) de los catabolitos del ATP, como resultado del tratamiento térmico.

Atendiendo individualmente a cada catabolito del ATP, aunque su tasa inicial es baja, es evidente una degradación rápida del AMP durante su almacenamiento refrigerado, y se corresponde con un descenso significativo en la conserva correspondiente a cada día de elaboración (Imagen 156).

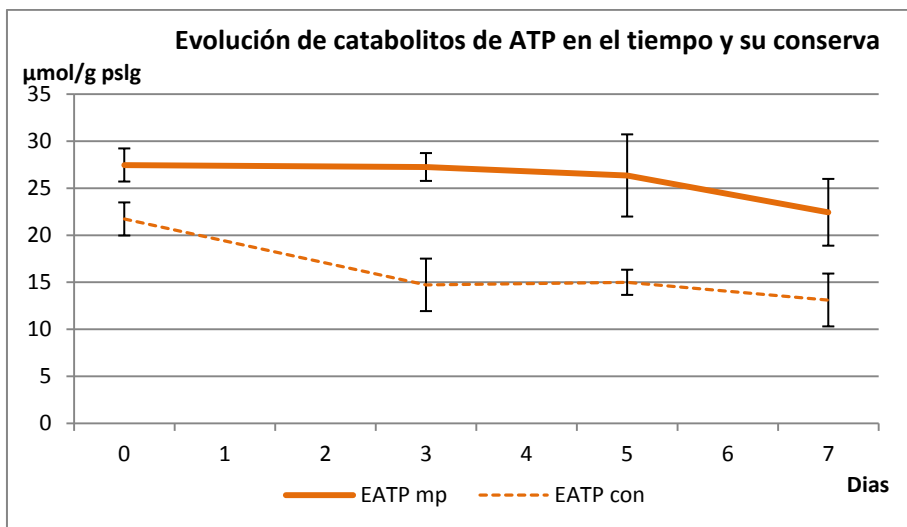


Imagen 155. Evolución del total de catabolitos del ATP de sardina, expresado en pslg, a lo largo del periodo de almacenamiento y sus correspondientes conservas (mp= materia prima; con=conserva).

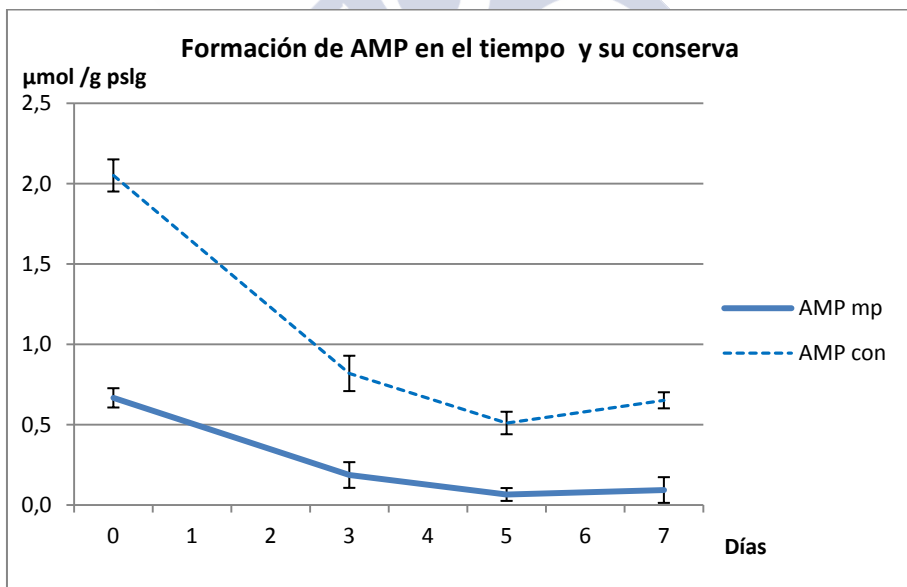


Imagen 156. Evolución del AMP de sardina, expresado en pslg, a lo largo del periodo de almacenamiento y sus correspondientes conservas (mp= materia prima; con=conserva).

Comparando los datos representados en las Imagen 157 y Imagen 158, se observa una pérdida significativa de IMP durante la etapa de materia prima, lineal, superior a 10 $\mu\text{mol/g}$ pslg hasta el final del estudio; este descenso no se corresponde tal y como cabría esperar con un incremento de HxR. En el caso del HxR, ésta aumenta hasta el día 5 para mantenerse hasta el día 7, como compensación entre la ganancia a partir de IMP y su degradación hacia Hx.

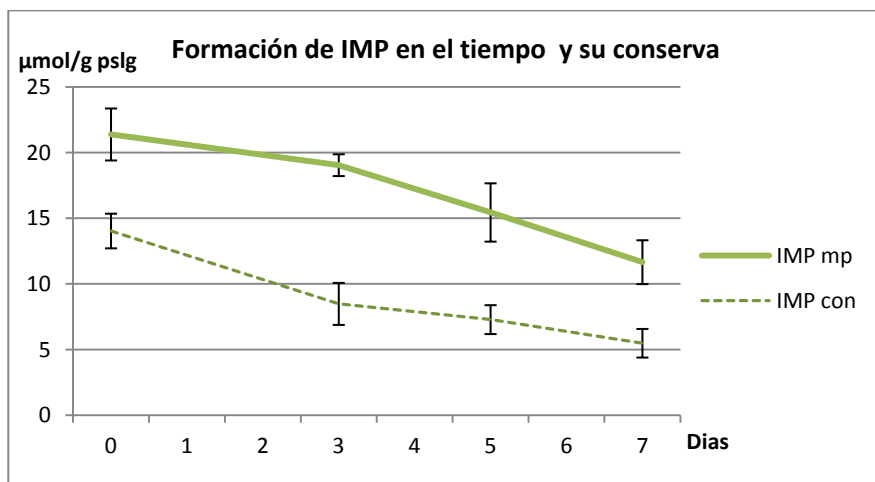


Imagen 157. Evolución del IMP de sardina, expresado en pslg, a lo largo del periodo de almacenamiento y sus correspondientes conservas (mp= materia prima; con=conserva).

En la Imagen 159, comparando los datos de materia prima y producto esterilizado de Hx, se observa un descenso de la concentración de este parámetro en el producto terminado. Sin embargo, es a partir del día 3 cuando la Hx aumenta alcanzando a final del estudio el doble respecto al día 0. Al comparar los resultados entre materia prima y conserva sólo existen diferencias significativas el día 0 ($p < 0,05$), pero muy pequeñas. Este parámetro presenta la mejor correlación entre la materia prima y su correspondiente conserva ($R^2 = 0,9699$).

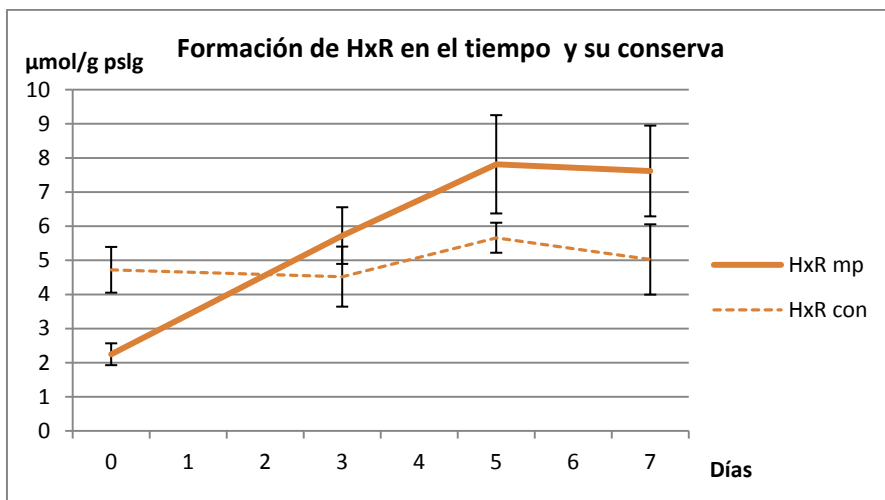


Imagen 158. Evolución del HxR de sardina, expresado en pslg, a lo largo del periodo de almacenamiento y sus correspondientes conservas (mp= materia prima; con=conserva).

En la Imagen 160, se observa como la relación de la Hx (valor H) respecto al total de catabolitos del ATP se incrementa tanto en la materia prima durante el tiempo de almacenamiento, como en la conserva elaborada con ésta.

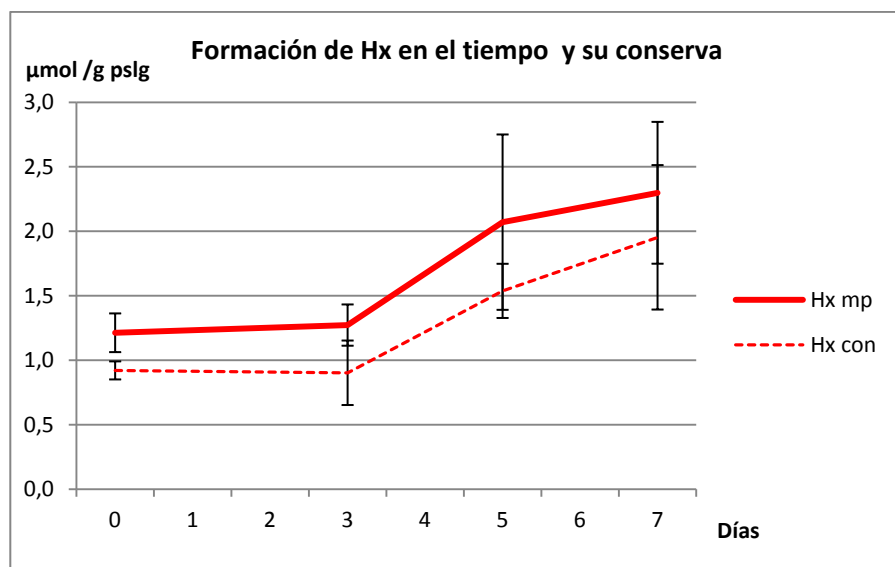


Imagen 159. Evolución del Hx de sardina, expresado en pslg, a lo largo del periodo de almacenamiento y sus correspondientes conservas (mp= materia prima; con=conserva).

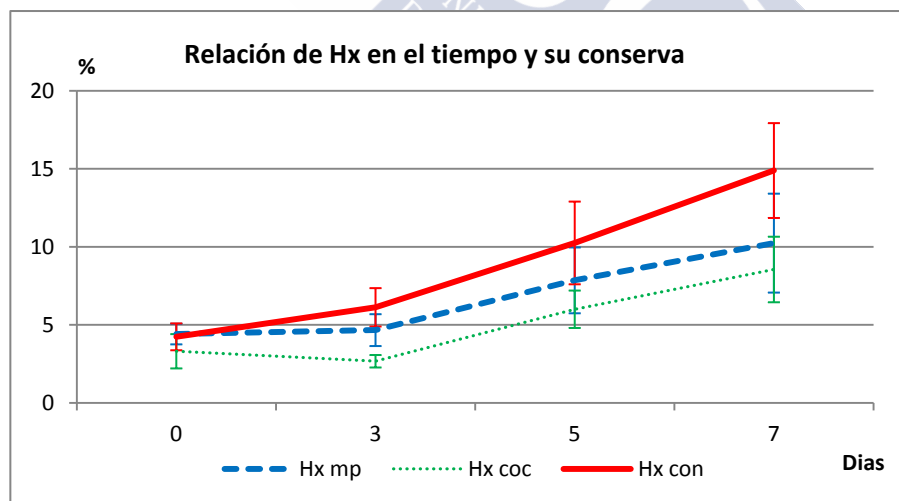


Imagen 160. Relación de Hx de sardina con respecto al total de catabolitos del ATP, a lo largo del periodo de almacenamiento y sus correspondientes conservas (mp= materia prima; coc= cocción; con=conserva).

Aunque se observa una mayor tasa en conserva en relación a la materia prima, esta diferencia no es significativa ($p>0,05$). En la materia prima, sólo se aprecian diferencias significativas entre el grupo de días 0 y 3 con el día 7, al igual que se observa en la conserva. Estudiando el Valor K_i (Imagen 161), se observan diferencias significativas ($p<0,05$) entre la materia prima y el producto enlatado, diferencias que están condicionadas por la pérdida mayoritaria de IMP.

Sin embargo, estas diferencias se reducen a medida que se deteriora la sardina (12,92% a día 0, 11,13% a día 3, 10,85% a día 5 y 8,95% a día 7). El valor K_i de la sardina, durante el periodo de almacenamiento, sufre un incremento significativo alcanzando valores de 25,6% al límite de su aptitud (día 3), que se corresponde con un 37% en su correspondiente conserva. Entre etapa de materia prima y cocción no se observan diferencias significativas para cada día de elaboración de conservas. Un estudio de correlación del Valor K entre materia prima y conserva es alto ($R^2=0,9992$), y a pesar del incremento manifestado en la conserva (proporcional en los 7 días de estudio), este parámetro puede ser usado como indicador de frescura de la materia prima, optimizando el proceso de elaboración de conservas.

En los siguientes gráficos (Imagen 162 a Imagen 165), se muestra la relación de cada nucleótido y purina según etapa de procesado, por día de toma de muestra. Se observa que el catabolito predominante durante los 7 días es el IMP, que es el que desciende drásticamente en la etapa de esterilización. Por todo ello, la *Sardina pilchardus* se definiría como una especie formadora de IMP.

Kuda y col (2007) observan en caballa *Scomber japonicus* que el ATP a AMP inicial es bajo, predominando IMP, que desciende tras la esterilización, aumentando mucho HxR y Hx ligeramente, a pesar de que otros autores indican que el IMP es termoestable (Tokunaga y col, 1982). Durante una semana a 4°C, el IMP desciende desde el día 2, aumentando HxR hasta día 4 y luego desciende. Hx sube rápidamente desde el 4º día. Día 2 60% valor K, y se estima un 35% en lata (121°C 30 min) para indicar un producto fresco.

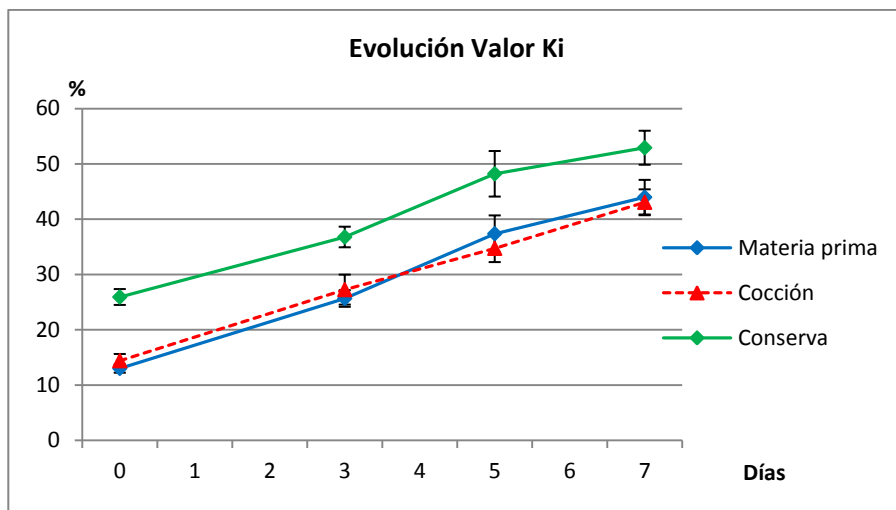


Imagen 161. Evolución del Valor Ki de sardina, expresado en pslg, a lo largo del periodo de almacenamiento y sus correspondientes conservas.

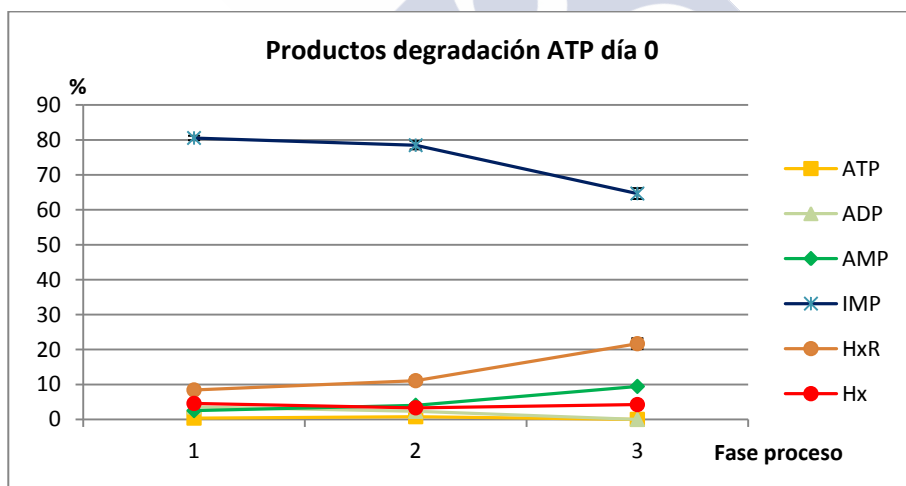


Imagen 162. Comportamiento y relación de las purinas y 5'-nucleótidos derivados del ATP de sardina según etapa de procesado, a día 0 de almacenamiento a +2°C (para fases de Procesado, 1= materia prima; 2= cocción; 3= esterilización).

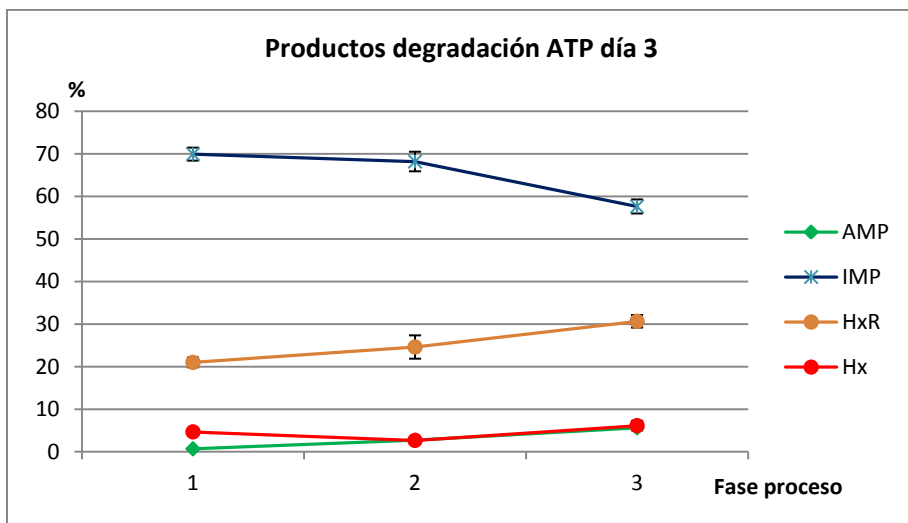


Imagen 163. Comportamiento y relación de las purinas y 5'-nucleótidos derivados del ATP de sardina según etapa de procesado, a día 3 de almacenamiento a +2°C (para fases de Procesado, 1= materia prima; 2= cocción; 3= esterilización).

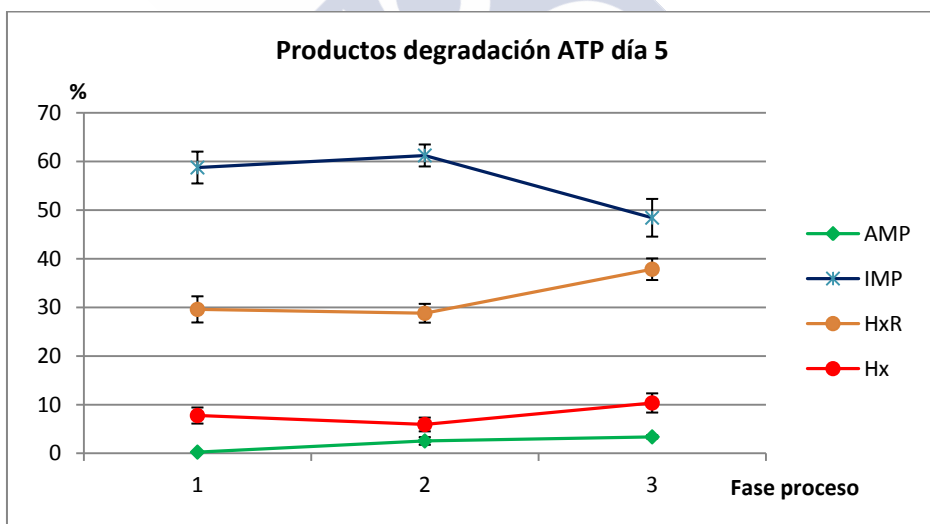


Imagen 164. Comportamiento y relación de las purinas y 5'-nucleótidos derivados del ATP de sardina según etapa de procesado, a día 5 de almacenamiento a +2°C (para fases de Procesado, 1= materia prima; 2= cocción; 3= esterilización).

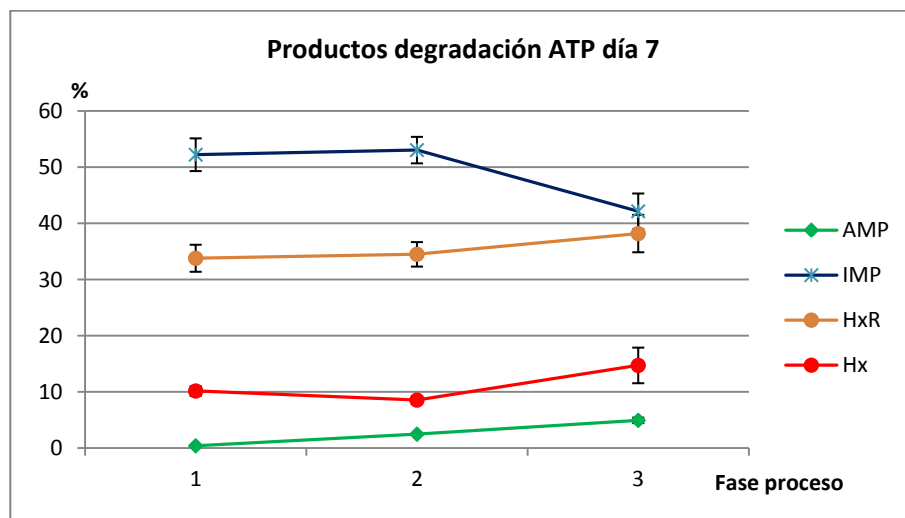


Imagen 165. Comportamiento y relación de las purinas y 5'-nucleótidos derivados del ATP de sardina según etapa de procesado, a día 7 de almacenamiento a +2°C (para fases de Procesado, 1= materia prima; 2= cocción; 3= esterilización).

Por otro lado, Kuda y col. (2008) con caballa, *Thunnus albacares*, *Oncorhynchus gorboscha* y *Pandalus borealis* muy frescos (para usar como *sashimi*) realizan esterilización de los productos envasados a vacío, a 115°C 90 min y 125°C 9 min (y además en caballa, a 120°C 29 min). En general, estos productos pesqueros sufren un aumento del valor K desde la materia prima (8,9%, 13,7%, 39,7% y 40,5%, respectivamente) hasta los posteriores tratamientos térmicos, valor K mayor en el caso de empleo de menor temperatura pero mayor tiempo de proceso. En el caso de caballa, se alcanza un 37,1%, 24,5% y 21,5% a 115°, 120° y 125°C, respectivamente. Ocurre principalmente una pérdida de IMP y ganancia de HxR.

La estacionalidad en la captura de sardina *Sardinella aurita* ha mostrado diferencias significativas en determinados parámetros empleados en frescura tras su descarga en puerto, observando que el valor K oscila de 12% a 24,1%, con bajos niveles de aminas biógenas en estos meses, destacando significativamente el contenido en ácidos grasos, especialmente de poliinsaturados (31,6% a 37%, EPA 14,2 a

16% y DHA 12 a 15,8%) (Valls y Paredes, 2010), o generando más BVT, índice de peróxidos, FFA, y desarrollo bacteriano en la estación invernal (Durmus y col., 2016).

Uriarte-Montoya y col. (2010) evalúa ciertos parámetros en fases previas al proceso de esterilización de *Sardinops sagax*, combinando en 1 día tiempo de demora (24 horas) y temperatura (2 a 20°C). Indican que la alteración lipídica, la formación de BVT y TMA son poco reseñables, con desarrollo casi nulo, ni siquiera aumenta la histamina (entre 6,2 y 6,7 ppm). El pH baja de 7,2 a 5,8 (rigor, 24 h) para subir posteriormente a 6,2 y mantenerse. Sólo el valor K sube desde 14% aproximadamente hasta 22% durante el ensayo (se considera calidad aceptable <45% y tasa superior a 60% como pescado alterado).

Sardinella aurita almacenada en hielo, entera y eviscerada durante 20 días, muestra un patrón de formación del Hx similar en ambos lotes (Valls y Delgado, 2000), sin mostrar diferencias significativas, considerando a esta especie una formadora de HxR, ya que el IMP se degrada rápidamente tras 3-6 días. Sólo el HxR muestra diferencias entre los 2 lotes. El valor K va de un 10-21% fresco a 42% tras 9-13 días. Este patrón se repite en diversas especies marinas y de agua dulce (Tamimoto y col., 1999). La rapidez del proceso de refrigeración tras la captura es importante para ralentizar el deterioro del ATP, pues se observó que para *Cleisthenes pinetorum* de igual talla (pescado procedente de arrastre y por tanto mucho más maltratado que el pescado de cerco), tras 4 días en hielo, el valor K fue inferior al 20% cuando se emplea agua fría, frente al 40% cuando la refrigeración fue lenta (con hielo), consiguiendo además un enfriado más efectivo de la zona visceral, retrasando así la actividad bacteriana y enzimática (Harada, 2006).

El uso de hielo líquido para enfriado (para 0, 5 y 9 días) se aplica también a Salmón *Oncorhynchus kisutch* (con 25-53% grasa) con el fin de elaborar conservas (Rodríguez y col., 2009). En general, la refrigeración favorece el incremento de ácidos grasos libres, aminos volátiles (BVT y TMA), de la cuales sólo se observa un incremento significativo por el tiempo en el caso de BVT y FFA en el producto esterilizado (entre día 0 y 5) así como de sustancias interactivas

resultado de la oxidación lipídica que se traducirá en un incremento de colores anómalos (pardeamiento), y durante el proceso de esterilización el calor favorece el aumento de la BVT y TMA (~3,6 mg N/100g) (Weber and Wilson, 1919; Shakila y col., 2005) y TBA (~1,7 mg MDA/kg) que no muestran diferencias significativas, y un aumento significativo del pardeamiento. Se estudia el valor K, como reflejo de la frescura del pescado fresco (Olafsdottir y col., 1997), descritos como productos estables térmicamente (Vázquez-Ortiz y col., 1997). El IMP apenas muestra diferencias significativas (datos como mmol/kg) en los 9 días, al contrario del HxR e Hx que aumentan significativamente (entre días 0 y 9). Sin embargo, el valor K indica un aumento significativo entre los diferentes días de elaboración de conservas, de 8,7% hasta 24,1%, indicando que no hay un efecto térmico sobre éstos datos y sugiriéndolo como un buen indicador del grado de frescura de la materia prima empleada cuando en ningún momento evalúa o indica el contenido en material fresco, previo tratamiento térmico.

Para esta misma especie de salmón, Rodríguez y col. (2010) emplean diferentes sistemas de enfriado (hielo líquido y tradicional) a lo largo de 1, 5 y 9 días. En producto en conserva no se aprecian diferencias significativas sensorialmente (textura, olor pútrido, turbidez) entre sistemas de enfriado ni en el tiempo a excepción del olor a rancidez (oxidado) y el color (pardeamiento). Sólo el valor K y FFA han mostrado diferencias significativas entre los sistemas de enfriado y a lo largo del tiempo. A nivel valor K, el salmón en conserva tras 9 días de refrigeración, muestra una diferencia de 5% entre los 2 sistemas de enfriado (30% para salmón previamente refrigerado con hielo tradicional), lo cual indica que el hielo líquido es eficaz en ralentizar procesos de degradación, aunque estos mismos autores no aportan datos de la materia prima de partida para cada día.

Sin embargo, Fuji y col. (1973) muestran valores de Hx más altos en conserva de salmónidos ante el valor de la materia prima (al contrario que nuestros resultados), proponiendo algunos autores el contenido de IMP como parámetro de evaluador del grado de frescura para este grupo de pescados, al ser representativo de la evolución presentada en materia prima fresca (Fuji y col., 1969) al igual que para

túnicos (Fujii y col., 1973; Gill y col., 1987), caballa (Tokunaga y col., 1982) o sardina (Taguchi y col., 1980; Iida y col., 1982). A pesar de estas propuestas, la pérdida que hemos observado en el IMP, desaconsejan dicha utilidad.

4.4.2.4. Idoneidad de las conservas de sardina

Los resultados químicos obtenidos se han correlacionado con el análisis sensorial a fin de hallar algún parámetro válido para poder caracterizar la materia prima empleada en la elaboración de conservas de sardina. Este parámetro, y en vista a los resultados obtenidos anteriormente, y para unas condiciones de proceso establecidas, deben mantener una correspondencia con la materia prima.

En la Tabla 65 se muestran los coeficientes obtenidos en regresión de los parámetros químicos y sensorial frente al tiempo de almacenamiento de la sardina preservada en hielo. Los valores límite de los parámetros químicos se han establecido en función de la intercepción en la recta de regresión del día en que la sardina ha sido rechazada sensorialmente con el valor correspondiente para cada parámetro químico.

Tabla 65. Coeficientes de regresión y valor límite obtenidos entre los parámetros químicos y el resultado sensorial frente al tiempo de almacenamiento de la sardina en hielo.

Parámetro	Pendiente	Intercepción	R ²	VL ^a
BVT ¹	-7,8311	74,124	0,9160	67,29
TMA ¹	-1,8351	5,2177	0,9402	4,38
Putrescina ²	-4,3288	14,171	0,9551	10,84
Histamina ²	-1,1119	2,5412	0,6209	2,43
Agmatina ²	-21,165	48,676	0,6043	28,51
Espermidina ²	-6,6312	34,699	0,9678	29,07
Cadaverina ²	-10,276	23,348	0,5529	14,07
TBA ³	-25,143	69,553	0,9984	45,41
Hx ⁴	-2,383	10,25	0,8735	8,87
Valor K _i ⁴	-12,492	48,1	0,9993	36,61

^a, Valor Límite del parámetro correspondiente expresado como ¹ mg N/100 g pslg; ² µg/g pslg; ³ mg MDA/kg pslg; ⁴ %

El día límite de aptitud de la sardina refrigerada en hielo es de 4 días. Teniendo en cuenta el día límite y que el coeficiente de correlación de cada parámetro químico sea lo más preciso, la TMA, putrescina, espermidina, índice de TBA y el Valor K_i son los parámetros más útiles a la hora de evaluar objetivamente el grado de frescura de la sardina refrigerada en hielo. La presencia de histamina, cadaverina, agmatina y/o relación Hx sería unos indicadores del grado de deterioro o alteración del músculo de la sardina como consecuencia de la actividad microbiana. Por otro lado, las BVT y la espermina no serían parámetros adecuados para definir el grado de frescura ni el grado de alteración de la sardina ya que la tasa de ambos parámetros se mantiene prácticamente constante durante el periodo de almacenamiento en las condiciones ensayadas, ya sea por pérdida o por ausencia de formación de estos compuestos.

La TMA, putrescina, espermidina, Valor K_i y el índice de TBA siguen un comportamiento lineal respecto al tiempo, por lo que han sido considerados como adecuados evaluadores del grado de frescura. Sin embargo, cuando atendemos a los resultados mostrados en la conserva, el primer parámetro en ser descartado como guía para conocer el estado de frescura de la materia prima es la TBA. Este parámetro sufre unas pérdidas considerables en el producto terminado a medida que el MDA resultante de la oxidación lipídica se incrementa a lo largo del periodo de mantenimiento en frío. Al igual ocurre con la TMA, que se mantiene a unos niveles similares en producto terminado, independientemente del contenido inicial que presente la materia prima.

Las aminas biógenas, en general, disminuyen en el producto en conserva, y la correlación entre materia prima y producto final no presenta una correlación alta ($<0,95$). Sin embargo, el Valor K_i , a pesar de la diferencia mostrada cada día entre materia prima y producto final, sigue una evolución pareja en las condiciones ensayadas, con una correlación alta ($R^2=0,9982$). En este experimento, la tasa de aminas biógenas (expresadas en peso fresco) es baja si se compara con las tasas de histamina encontradas en otras especies pelágicas como túnidos en conserva (Evangelista y col., 2016), o los datos ofrecidos para especies congeladas como materia prima para

conservas, en el caso de caballa y sardina, donde son frecuentes niveles entre 30 y 96 mg histamina/kg (Verkhivker y Altman, 2018). Esto indica la importancia y eficacia de una rapidez en el tratamiento a bordo del pescado, así como su adecuado almacenamiento posterior, como ha ocurrido en nuestro caso, donde la formación de histamina apenas llega a 1 mg/kg tanto en fresco como conserva, destacando en materia prima los 13 y 6 mg/kg de Agmatina y Cadaverina, respectivamente.

Sin embargo, la utilidad o no de un parámetro químico como indicador objetivo de la frescura del pescado es un tema muy controvertido (Sciuto y col., 2016). Así, consideran que las condiciones de almacenamiento son importantes a la hora de determinar si un parámetro determinado es útil como evaluador de frescura, siendo válido en ciertas condiciones y no en otras, como ocurre con el Valor K para *Thunnus albacares* almacenado a diferentes temperaturas (Guizani y col., 2005), o con el TBA y TMA en *Scomberomorus commerson* (Al-Jasser and Al-Jasass, 2014).

Para optimizar un indicador químico, la época en que se capture el pescado, es decir, el estado fisiológico del animal (Farmer y col., 2000) y la flora bacteriana asociada (Karthiayani y Mahadeva, 1967; Surendran y Gopakumar, 1982; Ababouch y col., 1996; Elotmani y col., 2004; Hagi y col., 2004; DeAngelis y col., 2010; Larsen y col., 2013), el arte, aparejo o forma de sacrificar el animal para su captura (Poisson y col., 2010; Digre y col., 2011; Teklemariam y col., 2015), la familia o especie de pescado (Fernández-Salguero and Mackie, 1983) y la tasa inicial de precursores de los productos de alteración son factores importantes a tener en cuenta como el OTMA (Tzikas y col., 2007; Samerotte y col., 2007) y la grasa (Henderson y Almater, 1989; Bandarra y col., 1997; Bandarra y col., 2001; Tzikas y col., 2007; Zlatanov y col., 2007; Munshi y col., 2005; Celik, 2008). Para considerar un parámetro químico objetivo que en principio parece útil como definitorio de las cualidades sensoriales de un pescado determinado en ciertas condiciones, éste tendría de ser reproducible para otras condiciones distintas como por ejemplo estado fisiológico y condiciones de almacenamiento.

Sin embargo, otro problema radica respecto al análisis sensorial, es decir, para una misma especie de pescado la valoración subjetiva o análisis sensorial puede ser diferente entre los catadores, bien por el tipo de consumidor, su estado anímico o fisiológico, factores psicológicos, sociológicos, culturales,...(Rodríguez, 1999a), por lo que muchas veces es difícil e incluso contradictorio interpretar los resultados. Así, algunos autores rechazan una sardina (*Sardina pilchardus*) en hielo con 10 días (Ababouch y col., 1991; Nunes y col., 1992; Nalan y col., 1998), un otros autores establecen 4 días (Triqui y Bouchriti, 2003), un catador español entrenado la rechaza al cabo de 3 días por sensaciones vinculadas a la rancidez (Rodríguez y col., 1991), mientras que un marinero gallego (catador no entrenado) puede llegar a ser más estricto rechazando sardinas con más de un día, al ser perfecto conocedor de las cualidades intrínsecas máximas de esta especie.

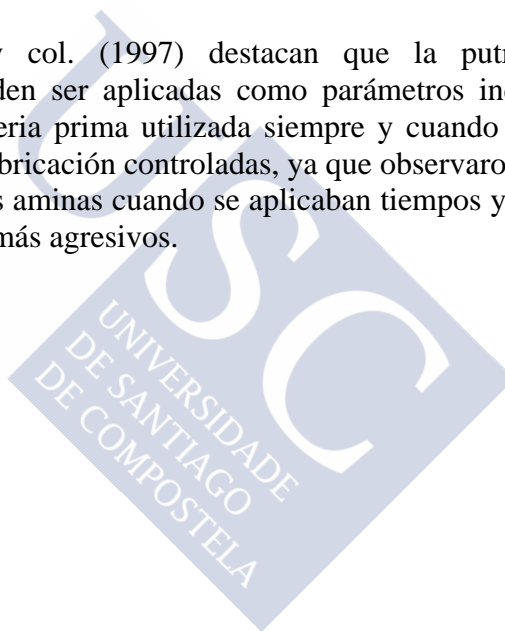
Esto no es más que un ejemplo de la dificultad para poder encontrar y definir un parámetro químico objetivo, ya que éste al final depende del análisis sensorial (que es el parámetro determinante de la aptitud de un pescado y cualquier otro producto alimenticio) el cual por su subjetividad sólo sería válido en el caso de que se utilizase siempre el mismo panel de catadores.

En el caso de la sardina, aunque los trabajos en relación a su grado de frescura durante el almacenamiento en hielo son escasos, en general se ha admitido Hx, BVT, TMA, carbonilos, etc. como parámetros químicos válidos para definir el límite de aptitud del pescado refrigerado (Gill y col., 1987; Hollingworth y col., 1987; Ryder y col., 1993; Civera y col., 1995). Sin embargo, otros autores no aceptan la TMA, las aminas biógenas, ni la TBA como indicadores del grado de frescura en pescado refrigerado, debido a la variabilidad de resultados vinculados al análisis sensorial, dependientes del modo de conservación, entre otros factores (Mietz y Karmas, 1978; Iida y col., 1982; Tokunaga y col., 1982; Besteiro y col., 1993). Por otro lado, cuando un alimento se somete a un tratamiento tecnológico (físico o químico), en este caso la elaboración de conservas de sardina, el compuesto que analizamos y que aceptamos como indicador del grado de frescura ha de permanecer estable a lo largo de todo el

proceso tecnológico, tal y como también postulan Barbosa y col. (2017) para *Katsowomus pelamis*.

De los parámetros químicos aceptados en este trabajo como indicadores útiles del grado de frescura durante el almacenamiento en hielo y utilizados durante la elaboración de sardinas en conserva, sólo la putrescina permanece constante a lo largo del proceso de conservas, independientemente del grado de deterioro. La espermidina, cuando posee un grado de frescura elevado, pierde durante el proceso parte de su contenido; sin embargo, cuando el músculo se halla más alterado, su concentración en la conserva no varía respecto a la materia prima utilizada.

Rodríguez y col. (1997) destacan que la putrescina y la espermidina pueden ser aplicadas como parámetros indicadores del estado de la materia prima utilizada siempre y cuando se trabaje en condiciones de fabricación controladas, ya que observaron una pérdida reseñable de estas aminos cuando se aplicaban tiempos y temperaturas de esterilización más agresivos.



4.4.3. Casos prácticos.

4.4.3.A. CASO 1. Estudio de calidad de conservas comerciales.

Como objetivo final de este trabajo nos propusimos establecer un estudio comparativo entre una serie de latas comerciales escogidas al azar en varios establecimientos de alimentación y contrastarlas con el tratamiento más adecuado llevado en este trabajo (115°C, 40 min), realizados en la segunda experiencia de conservas, a día 0 (capítulo 4.3.2). La filosofía ha sido el aplicar de un modo práctico el empleo de parámetros de frescura empleados en pescado fresco y que han sido determinados como correctos a la hora de evaluar el grado de frescura de la materia prima empleada para la elaboración de conservas de sardina, como conclusiones preliminares obtenidas tras el desarrollo e interpretación de los datos resultantes de los experimentos 4.3.1. y 4.3.2., expuestos anteriormente.

Los parámetros analizados para este estudio son las BVT, aminos biógenos y catabolitos del ATP así como un análisis organoléptico que nos sirva para observar si hay relación entre éste y los análisis químicos realizados. Las conservas comerciales escogidas fueron 4 marcas codificadas con letras latinas de la A hasta la D y la de referencia identificada como Ref. Estas marcas se corresponden a empresas líderes del sector, y que son fáciles de encontrar en la mayoría de los lineales de gran distribución. Por cuestiones éticas, no se citan dichas marcas, identificándolas con letras. Se han seleccionados conservas de sardina, en formato RR-125, con 3 piezas por envase.

1. ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO: El análisis organoléptico se realizó con el fin de comparar las marcas comerciales con la conserva de referencia realizada por en este trabajo y comprobar así la validez como indicadores de frescura, de los parámetros químicos analizados en las marcas comerciales.

Los resultados de este análisis son la media de las puntuaciones dadas por un panel de 10 jueces, 3 entrenados y 7 tipo consumidor, habituales de este tipo de producto (Tabla 66). Los 3 jueces

entrenados integran el panel mayoritariamente tipo consumidor, con el fin de interpretar los resultados que aportó en valor medio de la mayoría del panel.

Tabla 66. Valor medio (n=10) sensorial de sardinas comerciales de cada atributo y Valor Q.

Atributo sensorial	Muestras de conservas RR-125				
	A	B	C	D	Ref.
Color	1,52 \pm 0,43	1,30 \pm 0,40	0,62 \pm 0,45	1,52 \pm 0,35	1,69 \pm 0,67
Olor	2,50 \pm 0,39	2,58 \pm 0,42	0,62 \pm 0,43	2,62 \pm 0,36	1,87 \pm 0,62
Sabor	2,25 \pm 0,36	2,21 \pm 0,46	0,50 \pm 0,37	1,87 \pm 0,44	2,12 \pm 0,71
Textura	1,72 \pm 0,29	1,50 \pm 0,36	0,12 \pm 0,21	1,80 \pm 0,40	1,80 \pm 0,51
Valor Q	2,068	1,966	0,422	1,96	1,931

En ningún momento se les da pista acerca de la marca comercial o de comentarios al respecto de la calidad; esto es, una cata ciega, previo entrenamiento de los jueces de los términos usados en las tablas a cubrir. Las puntuaciones sensoriales se establecen entre 0 (mínima) y 3 (máxima calidad sensorial o idoneidad). El color de la conserva de referencia y su desviación típica es la media entre el valor del color del músculo y de marca de la espina. Además, para el caso del olor y el sabor, se pide al panel de cata que intente buscar descriptores exclusivos de la especie pesquera, descartando lo aportado por el aceite de cada conserva.

En general, la conserva mejor valorada ha sido la A, con un valor Q de 2,1, seguida de muestras B y D, mientras que la conserva de control (Ref), realizada con sardina recién capturada, se halla en 4ª posición. La muestra C es claramente rechazada en todos sus atributos sensoriales. Los parámetros sensoriales mejor evaluados han sido el olor y el sabor.

Se puede observar en el caso de la muestra control, que la desviación es mayor que la presentada en el resto de muestras, ya que en este caso existe una clara diferencias de los miembros del panel de cata, donde los jueces expertos o entrenados han valorado mejor las cualidades sensoriales de la conserva, mientras que el panel tipo consumidor, al no estar habituado a este tipo de producto de alta calidad sensorial, minusvalora estos atributos por su memoria sensorial al respecto de los productos habituales que consume. En la

Tabla 67 se muestran los datos individuales dados por todos los jueces, donde del 1 al 3 se corresponde con el juez entrenado.

Tabla 67. Valor sensorial ofrecido por cada juez del panel de cata para muestra de referencia.

jueces	Conserva RR-125 Referencia			
	COLOR	OLOR	SABOR	TEXTURA
1	2,3	2,6	3,0	2,4
2	2,7	2,5	2,8	2,7
3	2,8	2,7	3,0	2,2
4	1,4	1,0	1,2	1,6
5	1,3	1,5	2,4	1,8
6	1,7	2,2	2,6	1,3
7	1,3	1,3	1,7	1,4
8	1,0	1,2	1,5	2,0
9	1,3	2,0	1,4	1,4
10	1,1	1,7	1,6	1,2
MEDIA	1,69	1,87	2,12	1,8
Std*	0,67	0,62	0,71	0,51

*, desviación estándar

A continuación, exponemos los resultados individuales y su media para cada muestra comercial (Imagen 166) y se describen estos parámetros evaluados.

IA - Color: La conserva que alcanzó mayor puntuación en el color fue la de referencia (1,69) con un color crema muy claro y a penas perceptible la marca de espina, seguida de las A y D (1,52) de color crema, y la B (1,33), no encontrándose prácticamente diferencias entre ellas. El valor más bajo fue el alcanzado por la marca C (0,62), notablemente menor que las anteriores.

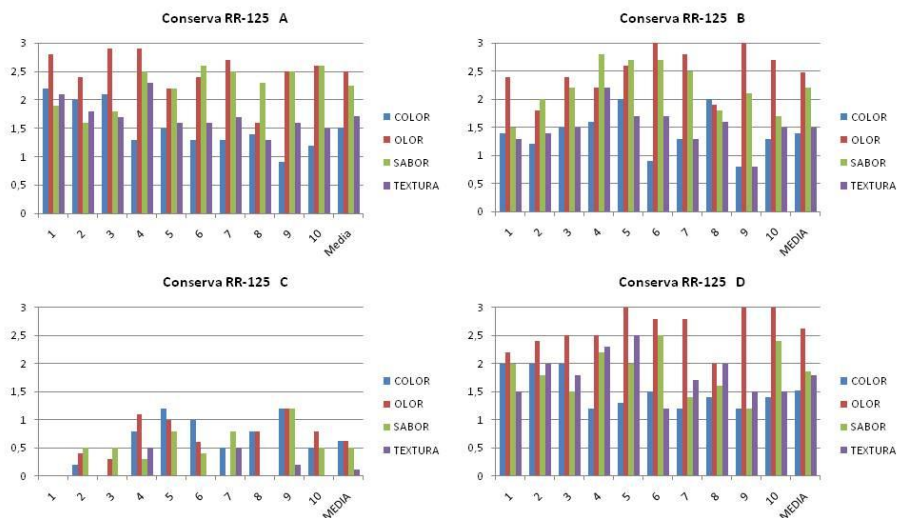


Imagen 166. Valoración sensorial de cada juez y según producto comercial.

El color de la conserva de referencia no se diferenció significativamente de la marcas A, B y D, aunque alcanzó una puntuación ligeramente superior debido su mayor grado de frescura, percibiéndose una tonalidad blanco-crema más clara que en las comerciales. En la marca C, la conserva con menor puntuación (0,62), los colores se encontraban alterados, con bordes amarillos, con tonalidades café con leche en el músculo claro e incluso tonos pardos a nivel de la columna y músculo adyacente a la cavidad abdominal, que desmerecían mucho la presencia del producto y fueron considerados como indicadores de degradación.

I.B - Olor: Respecto al olor, las marcas con un olor más característico a *conserva de sardina* fueron la D (2,62), seguida de la B (2,58) y la A (2,5) que no se diferenciaron entre sí ($p < 0,05$). La muestra de referencia alcanzó un valor ligeramente menor a las anteriores descendiendo casi un punto respecto a la mejor evaluada (1,87). La calificación más baja correspondió a la marca C, que se diferenció claramente de las anteriores con una puntuación mucho menor (0,62).

Por tanto, las marcas D, B y A obtuvieron prácticamente la misma puntuación siendo ésta cercana a 3 (excelente), por supuestas notas claras “a sardina”, la de referencia sin embargo, obtuvo casi un punto menos por su olor neutro a ligero “pescado salado”, pero agradable. La C alcanzó una puntuación muy baja (0,62) debido a la presencia de olores anómalos, rancios y ligeramente astringentes, típicos de sardina con indicios de degradación.

I.C - Sabor: En el sabor, las puntuaciones más altas fueron las alcanzadas por las conservas A y B (2,25 y 2,21 respectivamente), a continuación la de referencia (2,12) y la D (1,87), no se encontraron diferencias significativas entre ellas y de nuevo la más baja fue la C (0,5) al igual que en los casos anteriores.

El sabor más característico fue el de las marcas A, B y la de referencia, sobrepasando la puntuación 2, seguida de la D, cercana al 2. Esta diferencia es debida a un sabor que aunque típico del producto fue extraño y dulzón pero ligeramente agradable en la D. La C de nuevo alcanzó la calificación más baja al detectarse sabores anómalos, rancios, picantes, y en algunos casos, descripciones de los jueces como desagradables.

I.D - Textura: El valor más alto para la textura fue el obtenido por la conservas de referencia y la D (1,80), seguido de la A y B (1,72 y 1,5 respectivamente) sin encontrar diferencias entre ellas. Si bien, la muestra Ref se caracterizaba por su textura ligeramente blanda, fibrosa inicialmente, para tornarse ligeramente jugosa, mientras que los lotes A; B y D tenían una textura ligeramente más seca, que se tornaba pastosa a la masticación. La marca C obtuvo una puntuación muy baja (0,12) diferenciándose claramente de las otras marcas, con una textura muy seca y dura, que no es considerada típica del producto.

I.E - Valor Q: La clasificación de las marcas según el valor Q fue Clase II, buena (entre 1,50 y 2,25) para las conservas A, D, Ref y B, y Clase 0, mala (entre 0 y 1,125) para la C. Lo que confirmó, al ser

el Valor Q un índice integrador, las impresiones de las características organolépticas por separado.

En base a éstos resultados, podemos ver como el análisis organoléptico nos sirve para reconocer a grandes rasgos el estado de deterioro de la materia prima empleada, especialmente extremos, ya que si damos por correcta la conserva de referencia, observamos como ésta y las latas A, B, y D obtuvieron una puntuación similar, tanto en cada una de las características organolépticas independientemente como en el valor Q distanciándose de esta puntuación la marca C, que presentaba claros índices de deterioro de la materia prima.

2. COMPUESTOS DE DEGRADACIÓN: Los compuestos de degradación seleccionados para esta experiencia son BVT, aminas biógenas no volátiles y 5'-nucleótidos derivados del ATP. En la Tabla 68, se reflejan los valores medios para las aminas presentes en las conservas a estudio, expresadas en peso seco libre de grasa.

Tabla 68. Formación de aminas volátiles (BVT) y aminas biógenas en conservas de sardina.

Lotes	Análisis químicos (aminas)							
	BVT*	PUT*	TYR*	CAD*	HIS*	AGM*	SPN*	SPA*
A	86,0 ^a	2,32 ^a	0 ^a	0,54 ^a	1,39 ^a	4,12 ^a	4,15 ^a	6,63 ^a
	±11,32	±0,17		±0,44	±0,09	±1,67	±0,35	±0,37
B	82,1 ^a	3,49 ^b	0,42 ^a	1,29	1,42 ^a	6,07	5,57 ^a	7,5 ^a
	±8,61	±0,80	±0,67	±0,90 ^a	±0,11	±5,01 ^a	±1,11	±0,79
C	95,3 ^a	8,26 ^{a,b}	4,19	19,47 ^b	14,91 ^b	8,43	7,6 ^a	9,84 ^a
	±11,79	±5,37	±4,27 ^a	±16,35	±11,56	±6,48 ^a	±2,0	±2,24
D	88,5 ^a	5,11 ^{a,b}	0,93 ^b	4,52 ^{a,b}	1,81 ^a	3,7	8,01 ^a	11,1 ^a
	±11,44	±2,77	±1,45	±4,76	±0,51	±2,65 ^a	±3,59	±3,58
Ref	124,6 ^b	17,03 ^c	0 ^a	0 ^a	0 ^c	0 ^b	27,74 ^b	25,83 ^b
	±7,67	±1,65					±3,46	±3,24

(*) expresado en mg N/100 g pslg; (+) expresado como µg/g pslg. Letras en superíndice diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05 n=5).

BVT no muestran diferencias significativas entre las marcas comerciales, pero sí del grupo de éstas con la muestra de Referencia que supera con creces este parámetro químico a las muestras comerciales.

Estos datos contradicen en un principio lo esperado, ya que la sardina de referencia poseía un elevado grado de frescura, pero hay que tener en cuenta que desconocemos características del proceso de fabricación de las conservas comerciales, como el tiempo y condiciones de almacenamiento previo al proceso de elaboración de conservas, permanencia en salmuera, cocción, tiempo y temperatura de esterilización, que podrían alterar esta cantidad de BVT. Pero en el capítulo 4.3.2 se observó que a medida que la frescura se pierde en el tiempo de almacenamiento de la materia prima refrigerada, su transformación en conserva genera menos cantidad de compuestos nitrogenados volátiles, lo cual justificaría esta bajada de BVT en las conservas comerciales.

Las causas por las cuales se obtuvieron cantidades más bajas en las muestras comerciales ya se explicó que esta condicionada por dilución parcial en el agua de la salmuera, pero las más mayores pérdidas tienen lugar en la etapa de cocción, sobre todo NH_3 .

Al estudiar las aminas biógenas presentes en las muestras comerciales, se identifican putrescina, tiramina, cadaverina, histamina, agmatina, espermidina y espermina. En la conserva de control (Ref) sólo destaca la presencia de elevadas tasas de PUT (17,03 $\mu\text{g/g}$), SPN y SPA (con 27 y 25 $\mu\text{g/g}$, respectivamente, entre 3 y 2 veces más que las comerciales), aminas ya presentes in vivo, con ausencia incluso a nivel de trazas ($<0,05$ ppm) de aminas características de putrefacción o de actividad bacteriana, como la tiramina, cadaverina, histamina y agmatina.

Las causas que explicarían las bajas cantidades de aminas encontradas en las latas comerciales respecto a las del lote de referencia podrían ser varias. Se han encontrado variaciones estacionales y debido a la talla en la cantidad de putrescina, espermidina y espermina (Veciana-Nogues, 1993). También se produjeron pérdidas de aminas por dilución en el líquido de exudado durante la cocción, estas serían mayores cuanto mayor sea el tiempo de duración de esta fase y también salidas al líquido de gobierno durante la esterilización al ser el proceso térmico más agresivo.

El hecho de que apareciesen aminas características de putrefacción como tiramina, cadaverina, histamina y agmatina en

cantidades apreciables, indican que la sardina empleada en la conserva había comenzado ya su degradación bacteriana.

Hay que resaltar las altas cantidades encontradas en la marca C con respecto a las otras muestras comerciales, en las cuales los valores de cadaverina e histamina fueron respectivamente 19,47 $\mu\text{g/g}$ y 14,91 $\mu\text{g/g}$, más altos que los encontrados para marca D (4,52 $\mu\text{g/g}$ y 1,81 $\mu\text{g/g}$, respectivamente), que es la que también alcanzó elevadas cantidades dentro de las cuatro marcas comerciales analizadas.

Por lote comercial, en el A destaca de más a menos concentración, AGM, PUT, HIS y CAD, lo cual, y siempre basándonos en nuestro trabajo, indica que en este lote, la materia prima estuvo sometida a bajas temperaturas de conservación antes de la elaboración de conservas. No contemplamos comentar de SPA y SPA, por su escasa incidencia en la formación en el tiempo de almacenamiento que se ha observado en nuestro trabajo y por la bibliografía consultada. En el caso del lote B, sigue la misma pauta que el lote A, con un ligero incremento en el mismo orden de generación de aminas, más trazas de TYR.

El lote C, es el que muestra ya diferencias más claras respecto al resto de lotes, con una dominancia de CAD (19,5 $\mu\text{g/g}$), seguida de HIS (14,9 $\mu\text{g/g}$), AGM (8,4 $\mu\text{g/g}$), PUT (8,3 $\mu\text{g/g}$) y TYR. Estos resultados sugieren que la materia prima estuvo en condiciones superiores a los 4°C, pero con una tasa de formación baja en fresco. Finalmente, en el lote D predomina CAD, PUT, AGM e HIS, al que también se le deduce un almacenamiento en condiciones de frío por encima de los 4°C. En cualquier caso, es evidente y en relación a los resultados sensoriales obtenidos, el lote C es el lote que en teoría ha utilizado una materia prima menos fresca.

En base a estos resultados, la calidad de la materia prima empleada en la conserva de mejor a peor sería:

Lote Ref. > Lote A > Lote B > Lote D > Lote C

Para apoyar estas conclusiones, se realiza un estudio de los 5'-nucleótidos y purinas de degradación del ATP, expresado en peso seco libre de grasa (Tabla 69). Pero estos resultados son

transformados como la relación de cada uno de los catabolitos con respecto a la suma total de éstos, así como el Valor K_i (Tabla 70), que como señalamos en anteriores capítulos, su formación lineal tanto en materia prima como en la conserva, sería buen indicador del grado de frescura, a lo que se estableció un valor límite de entre 40-45 %.

Tabla 69. Formación de catabolitos del ATP* en conservas de sardinas comerciales.

Lotes	Hx	HxR	IMP	AMP	Σ ATP
A	2,07 \pm 0,10 ^a	6,37 \pm 0,20 ^a	5,46 \pm 0,65 ^a	0,78 \pm 0,08 ^a	14,68 ^a
B	1,38 \pm 0,01 ^b	4,48 \pm 0,33 ^b	6,41 \pm 0,38 ^a	0,86 \pm 0,12 ^{ab}	13,07 ^a
C	2,6 \pm 1,01 ^{ab}	5,67 \pm 1,18 ^{ab}	5,72 \pm 1,34 ^a	0,65 \pm 0,12 ^a	14,62 ^a
D	1,45 \pm 0,55 ^{abc}	4,86 \pm 1,38 ^{ab}	6,20 \pm 0,97 ^a	0,92 \pm 0,11 ^b	13,43 ^a
Ref	0,92 \pm 0,20 ^c	4,72 \pm 0,69 ^{ab}	14,03 \pm 1,23 ^b	2,05 \pm 0,15 ^c	21,72 ^a

(*) expresado como μ mol/g pslg. Letras en superíndice diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$ $n=5$).

Si se comparan los sumatorios de la cantidad total de 5'-nucleótidos y purinas (Σ ATP), encontramos que no se aprecian diferencias significativas, por lo que las pérdidas de los catabolitos del ATP (de existir) han sido similares, sin diferencias significativas siquiera con la muestra de referencia, a pesar de presentar una cantidad total superior. Los valores en peso fresco, muestran que prácticamente la formación de Hx es similar ($p < 0,05$) a excepción del lote B, pero son tasas muy bajas, siendo el lote Ref el que menor tasa presenta. Al igual ocurre con la HxR, donde sólo se observan diferencias ($p < 0,05$) entre el lote B respecto al A, una mayor tasa en el último. Respecto al IMP, no se observan diferencias entre los lotes comerciales, con una clara excepción en el lote Ref. ($p < 0,05$), con una mayor tasa respecto al resto.

Tabla 70. Relación de catabolitos del ATP* en conservas de sardinas comerciales.

Lotes	Hx	HxR	IMP	AMP	Valor K _i
A	14,10 ^{ab}	43,39 ^a	37,19 ^a	5,31 ^a	60,72 ^a
B	10,51 ^a	34,12 ^b	48,82 ^b	6,55 ^{ac}	47,76 ^b
C	17,78 ^b	38,78 ^{ab}	38,99 ^a	4,45 ^b	59,20 ^a
D	10,80 ^a	36,19 ^{ab}	46,17 ^b	6,85 ^c	50,44 ^b
Ref	4,24 ^c	21,73 ^c	64,59 ^c	9,44 ^d	28,67 ^c

(*) expresado en % de cada catabolito del ATP, respecto a la suma total de los presentados en anterior tabla. Letras en superíndice diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$ $n=5$).

Atendiendo a la relación (%) que supone cada catabolito respecto al total, es evidente que el lote C muestra un valor Hx superior ($p < 0,05$) al resto, que son similares en los lotes comerciales, estando el lote A entre los extremos de valor superior e inferior de éstos, pero el lote Ref. muestra unos niveles significativamente bajos. Atendiendo a la relación HxR/IMP, el lote A muestra un mayor formación de HxR. Los lotes B, D y Ref presentan mayor tasa de IMP, destacando significativamente el lote control (Ref), que presenta el mayor valor de IMP de todos los lotes (65%). Por último, el lote C presenta tasas similares de ambos catabolitos.

Finalmente, el valor K_i del lote Ref., con materia prima recién capturada, muestra el valor más bajo 28,67% ($p < 0,05$). Destacan de menos a más valor el lote B, D, C y A, con 48, 50, 59 y 61%, respectivamente.

En base a estos resultados (valor K_i), y basándonos en los resultados de los capítulos anteriores, la calidad de la materia prima utilizada para la elaboración de las conservas de mejor a peor sería:

$$\text{Lote Ref} > \text{Lote B} > \text{Lote D} > \text{Lote C} \geq \text{Lote A}$$

Comparando las valoraciones de calidad establecidas por los datos de catabolitos del ATP con el valor de las aminos biógenas y análisis sensorial (Valor Q):

Aminas Biógenas: Lote Ref. > Lote A > Lote B > Lote D > Lote C

Valor Q: Lote A ≥ Lote B = Lote D = Lote Ref >
 Lote C

Los datos conjunto del panel de cata, consideran que el valor global de las conservas A, B, D y Ref, son iguales ($p>0,05$), destacando el lote C claramente ($p<0,05$). Si sólo se considerarán los resultados de los jueces entrenados (3), el orden de valoración sensorial de mejor a peor resultado sería $\text{Ref.} > A \geq D > B > C$.

Valorando los resultados del análisis organoléptico con las cantidad y dominancia de aminas biógenas, vemos como el lote C destaca negativamente sobre el resto ($p < 0,05$), mientras que los lotes comerciales restantes estarían en una calidad intermedia, y si valoramos como dominante en estado de refrigeración con temperaturas bajas a la AGM (basado en resultados de esta tesis), destacaría como mejor el lote A.

El lote A se halla en una controversia, al tener una menor tasa de aminas biógenas comparado con el resto de lotes comerciales, pero por el contrario presenta una mayor relación de Hx y Valor K_i , además de presentar un valor Q más alto a nivel consumidor. Esto refuerza que el pescado estuvo en condiciones de almacenamiento refrigerado bajo, pero durante un tiempo prolongado, que minimizaría el desarrollo bacteriano, de ahí las bajas tasas de aminas y dominancia de AGM, pero con una degradación autolítica continua, reflejado en la secuencia de degradación del ATP. En el caso de los lotes B y D, en este orden, por los datos de aminas biógenas y degradación de catabolitos del ATP, ambos lotes son similares.

4.4.3.B. CASO 2. Estudio de idoneidad de conservas de sardina tras etapa de producción industrial.

El objetivo planteado en este caso, es evaluar la calidad de la conserva de sardina (“*sardinilla*”) de una empresa conservera gallega, por quejas/rechazo manifestadas en su panel de cata, partiendo de la base que la materia prima empleada era de calidad sensorial aceptable por los criterios de calidad de la empresa.

Se reciben diversos lotes de sardina congelada, la cual pudo ser origen de la producción problema, así como otros productos ya esterilizados (talla pequeña, 8-9 piezas envase), para evaluar el grado de frescura y/o aptitud de materias primas y del producto terminado (año producción 2010). Los lotes recibidos de fábrica se identifican con los siguientes códigos:

Lote fábrica	En adelante
Sardinilla congelada 13-04-10	MP13
Sardinilla congelada 18-04-10	MP18
Sardinilla congelada 23-04-10	MP23
Sardinilla congelada 26-04-10	MP26
L110J 1P16 12.00424-PO 18:29	Lote A*
L64J 9P16 12.00424-PO 20:54	Lote 1
L70J 3P16 12.00424-PO 22:11	Lote 2
L76J 7P16 12.00424-PO 12:51	Lote 3
L82J 9P16 12.00424-PO 12:28	Lote 4
L95J 6P196 12.00424-PO 11:33	Lote 5
L95J 6P06 12.00424-PO 15:35	Lote 6

(*) lote problema, entregado el día 30 de Abril de 2010.

En la evaluación de conservas, se analizan los siguientes parámetros, de rutina en control de conservas:

- Apariencia a la apertura.
- Control de pesos.
- Líquido de cobertura.
- Análisis sensorial. Panel de cata constituido por 7 jueces. Se elabora una escala de 0 a 5 puntos, donde 0 indica ausencia, 1 indicios y 5 intenso para el parámetro evaluado (perfil de textura):

- ❖ Color amarillo
- ❖ Color crema
- ❖ Marca de la columna vertebral (espina)
- ❖ Olor a rancio
- ❖ Olor a “sardina”
- ❖ Olor extraño (tostado, neutro, oxidado, etc.)
- ❖ Sabor salado
- ❖ Sabor rancio
- ❖ Textura harinosa/pastosa
- ❖ Textura fibrosa
- Sabor Específico, el valor mínimo indica sabor específico de la especie de pescado, 3 neutro y 5 intenso a pescado (“sardina”). Valores esperados entre 0 y 2.
- Textura Dureza, donde 0 es muy blando y 5 muy duro. Valor esperado entre 3 y 4.
- Textura Jugosidad, donde 0 muy seco y 5 muy duro. Valor esperado entre 3 y 4.

Control de conservas. Los lotes de conservas analizados presentan un rango de peso escurrido entre 69 y 80 % de capacidad nominal, cuyos valores medios se exponen en la Tabla 71; en 5 casos (23%) ha sido inferior al límite establecido en la Norma de Calidad de la UE (<70% de peso escurrido), como consecuencia el empaque es flojo ().

Tabla 71. Control de pesos de conservas de sardinilla.

Lote	% Peso escurrido/CN	% Peso neto/CN	ml líquido de gobierno
A	75,21	101,37	25,3
1	73,81	101,76	27,1
2	79,57	103,61	23,0
3	72,13	99,40	21,4
4	75,30	100,70	25,0
5	74,26	100,34	23,3
6	78,86	103,16	24,0

Se ha observado una heterogeneidad en el color del aceite de envasado (Imagen 167) en función de los lotes: color ámbar lotes 3 a

6, y color amarillo claro lotes A, 1 y 2. El porcentaje de agua en el líquido de gobierno es inferior al 1% en todos los casos.

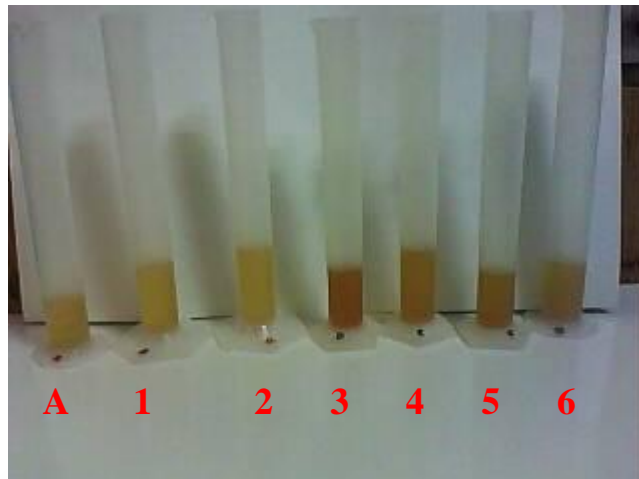


Imagen 167. Color del aceite de las conservas.



Imagen 168. Prueba de Kreiss del aceite. Color rosado más intenso indica mayor rancidez.

La prueba de Kreiss indica un grado de oxidación lipídico superior en el lote 3, seguido por intensidad los lotes 4, 1, A, y el tono de color más leve corresponde a los lotes 5, 6 y 2 (

Imagen 168). Es decir, el aceite del lote 3 está rancio, y moderadamente rancio los lotes 4, 1 y A.

La apariencia a la apertura de los lotes A, 5 y 6 es de color plateado, con presencia de escamas, mientras que la de los lotes restantes (1, 2, 3 y 4), el color plateado de la piel se ve alterado por una tonalidad ocre tenue, principalmente en las zonas con escamas y base de las aletas. En la Imagen 169 se muestran tales lotes analizados donde se observa la variación cromática comentada, salvo la conserva lote A, de apariencia similar a los lotes 5 y 6.



Imagen 169. Apariencia a la apertura de los lotes de conservas de sardinilla 1 a 6.

Análisis Sensorial de materia prima congelada. El análisis sensorial de los lotes MP18, MP23 y MP26 de sardinillas descongeladas tienen una categoría de frescura A y el lote MP13 categoría B: 20% textura ligeramente blanda, opérculo con extravasaciones sanguíneas y olor de la branquia ligeramente a pescado (baremo sensorial de los R.D. 331/1999 y R.D. 121/2004 establecido para peces azules o pelágicos). No se apreciaron ejemplares reventados en la zona visceral a pesar del alto contenido estomacal, de tono rojizo y según su identificación al estereomicroscopio se corresponden a larvas de crustáceos.

En relación a la textura, el grado de consistencia ha sido el siguiente:

$$\text{MP26} > \text{MP18} \geq \text{MP23} > \text{MP13}.$$

Análisis Sensorial de conservas. Los resultados sensoriales obtenidos se muestran en gráficos de perfil de araña (Perfil Sensorial), frente a un lote control u óptimo para este tipo de producto (Imagen 170).

El color de la marca de la espina es de un tono crema en el lote A y 6, de color crema-pardo el lote 5, rosado intenso el lote 1, rojo mate intenso el lote 2, y de rojo oscuro-pardo oscuro los lotes 3 y 4. La marca de la espina es un factor importante ya que indica el grado de deterioro y/o inicio de la actividad enzimática en los tejidos internos, que quedan reflejados en la masa muscular adyacente por extravasación sanguínea. En los lotes 1, 3, 4 y 5 al abrir las piezas, se observa un color amarillento de la grasa subcutánea así como en la zona de inserción muscular de las aletas. A continuación se expone el aspecto de las muestras de conserva de sardinilla evaluadas tras separar los filetes y retirar la columna vertebral (ver fotografías adjuntas).

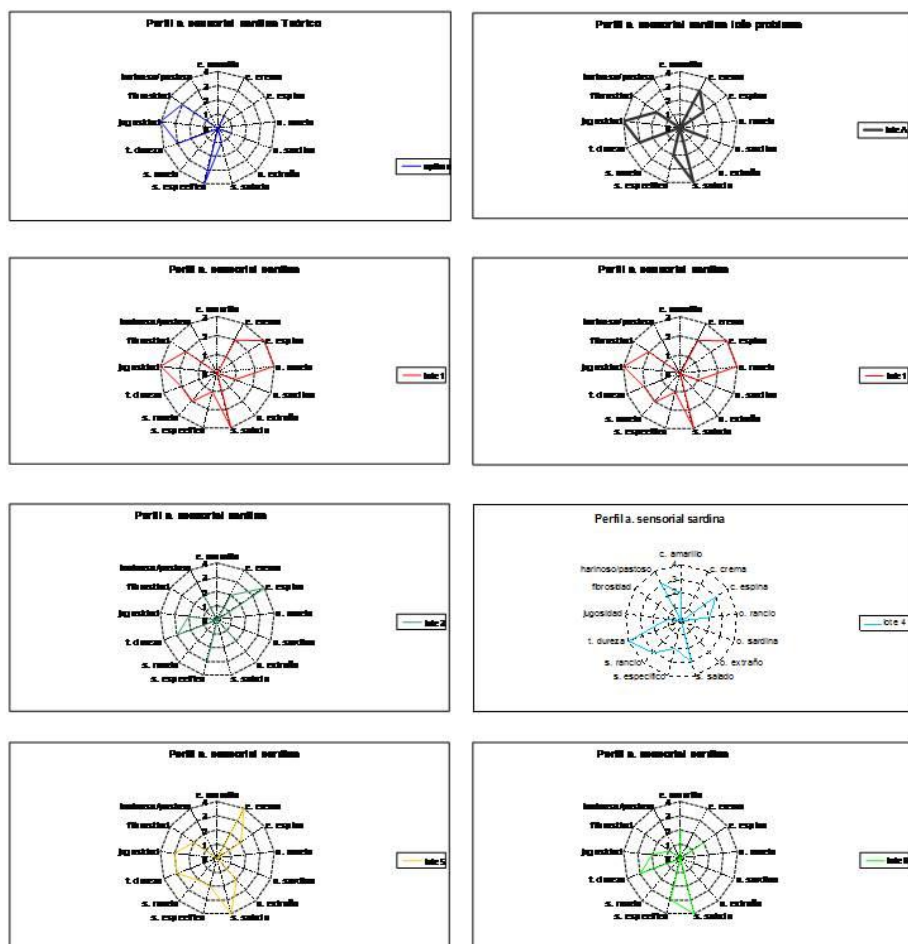
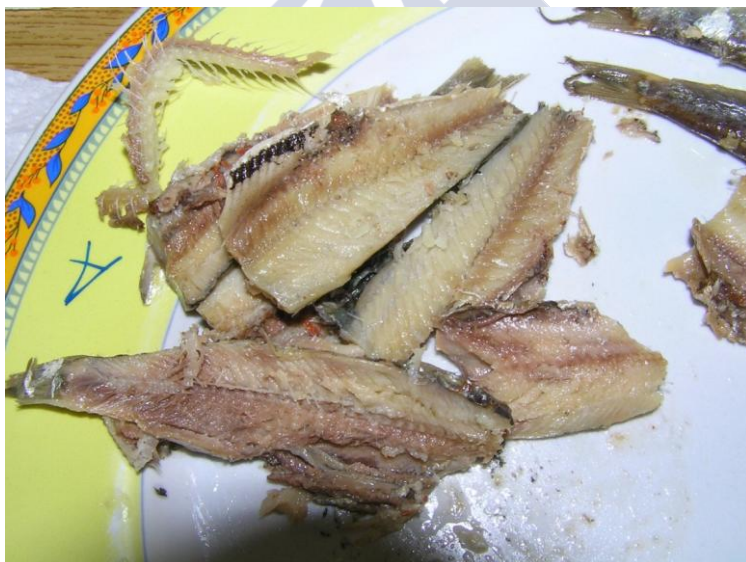


Imagen 170. Resultado análisis sensorial de conservas de sardinilla.



Vista comparativa de las muestras correspondientes a los lotes A (izquierda), 1 (inferior), 2 (derecha) y 3 (superior).



Lote A, marca de la espina menos acusada (color crema), músculo crema claro la mayor. Heterogeneidad en el color del músculo; obsérvese el ejemplar inferior, con aspecto más lisado en su musculatura ventral.



Lote 1. Tonos amarillos en zona subcutánea; color rosado del músculo y marca de la espina muy marcada rojo oscuro.



Lote 2, marca de la espina muy marcada (rojo oscuro), músculo más claro pero con extravasaciones sanguíneas de las espinas vertebrales.



Lote 3. Color del músculo entre crema y rosado. Columna vertebral muy marcada, tonos amarillentos. Textura muy blanda (obsérvese ejemplar superior tras su manipulación como el resto de lotes).



Vista comparativa de las muestras correspondientes a los lotes 4 (derecha), 5 (izquierda) y 6 (superior).



Lote 4, heterogeniedad en color del músculo: crema claro, rosado claro, tonos amarillentos.



Lote 5, color músculo crema claro, marca de la columna parda o roja , con extravasaciones de las espinas vertebrales y oxidación lipídica subcutánea (tonos amarillos).



Lote 6. Color homogéneo del músculo (crema claro); mayoría de ejemplares con columna poco marcada (crema).

El criterio del panel de cata considera texturas secas y duras, olores y sabores rancios y “*a sardina*”, colores muy claros o crema hacia tonos pardos y la marca de la espina como parámetros poco adecuados a este tipo de producto. Así, por la apariencia a la apertura, los lotes A, 5 y 6 son los mejores; por el olor, los lotes A, 5 y 6; por la marca de la espina, A y 6. Por sabor, lotes 1 y 2; por color del músculo, lotes 1 y 6, y finalmente por textura los lotes A, 1 y 5. Tal y como se observó en los gráficos de telas de araña, todos los valores de los parámetros estudiados al compararlos con el perfil de la muestra teórica, se detectan grandes desviaciones entre los diferentes lotes. La muestra problema, Lote A:

- la textura es más cercana al lote teórico, especialmente por la textura firme y su jugosidad (retención de agua tisular);
- el color crema del músculo, el color y marca de la espina, el olor a sardina y su menor fibrosidad disminuye su valoración global.

En relación a la jugosidad, encontramos similar al lote A, los lotes 1 y 5, y por dureza los lotes 1, 5 y 6. Con una textura menos jugosa y más dura está el resto de lotes, especialmente las muestras 3 y 4.

Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, el panel de cata determina que las mejores conservas son las codificadas como A y 6. También es preciso indicar que entre latas, y dentro de una misma lata, correspondientes al mismo lote, existe heterogeneidad en los parámetros comentados.

Análisis bioquímicos. En la Tabla 72 se muestran los valores medios bioquímicos de composición (humedad, lípidos y cloruros). De la Imagen 171 a Imagen 173 se representan los parámetros de alteración BVT, TBA y purinas de degradación del ATP representadas como Valor $K_i = [(Hx + HxR) \times 100 / (Hx + HxR + IMP)]$, respectivamente.

Tabla 72. Contenido en agua, lípidos y cloruros.

Lote fábrica	Lote	H	L	NaCl
Sardinilla 13-04-10	MP13	68,8	8,2	0,7
Sardinilla 18-04-10	MP18	67,9	7,8	0,8
Sardinilla 23-04-10	MP23	68,3	8,4	0,7
Sardinilla 26-04-10	MP26	67,8	8,6	0,7
L110J 1P16	Lote A	64,1	6,5	1,6
L64J 9P16	Lote 1	63,4	6,7	1,8
L70J 3P16	Lote 2	65,7	4,9	2,8
L76J 7P16	Lote 3	64,2	5,6	1,1
L82J 9P16	Lote 4	64,4	7,2	1,5
L95J 6P196	Lote 5	64,3	6,1	2,0
L95J 6P06	Lote 6	66,1	5,3	2,3

Donde H, humedad (%); L, lípidos (%); NaCl, sal común (%).

No se aprecian diferencias significativas en la humedad, lípidos y cloruros de los 4 lotes de materia prima estudiados. El proceso de esterilización al que han sido sometidas las materias primas (lote A), provoca que la tasa de sal se incremente, disminuyendo el contenido de lípidos en torno a 2% y un 4% el contenido acuoso.

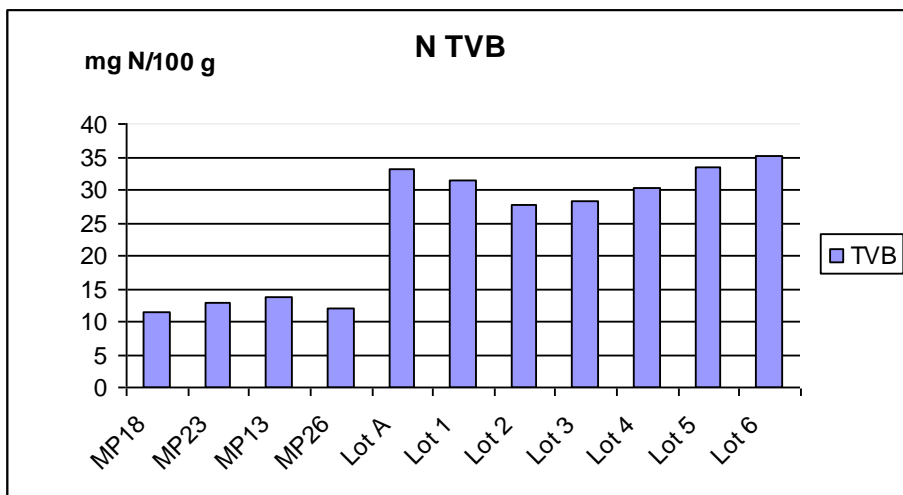


Imagen 171. Contenido de nitrógeno BVT de materias primas y conservas de sardinilla.

En la Tabla 73 se indican los valores medios de aminas biógenas. Se identifican las siguientes aminas: putrescina, tiramina, cadaverina, histamina, agmatina, β -feniletilamina, espermidina y espermina. Sólo se indican las 5 primeras al ser las que presentan diferencias significativas entre los lotes. Las aminas restantes permanecen constantes por lo que no se consideran.

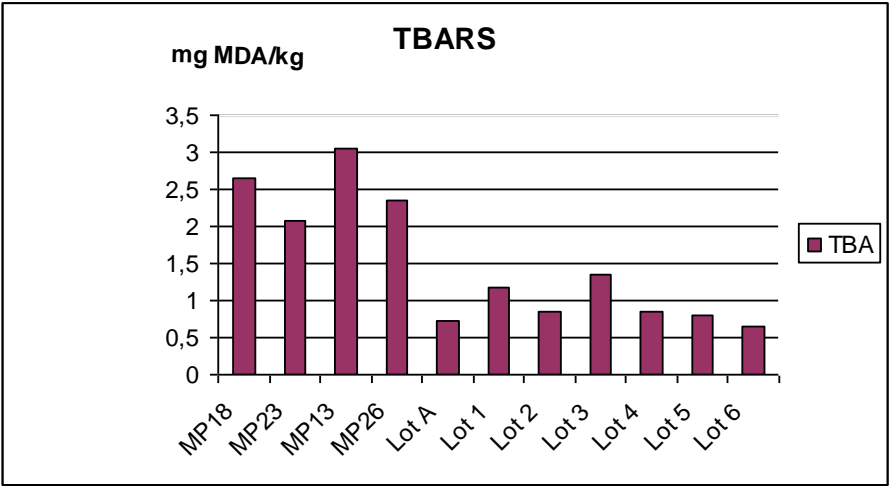


Imagen 172. Contenido de sustancias reactivas con el TBA (MDA) en materias primas y conservas de sardinilla.

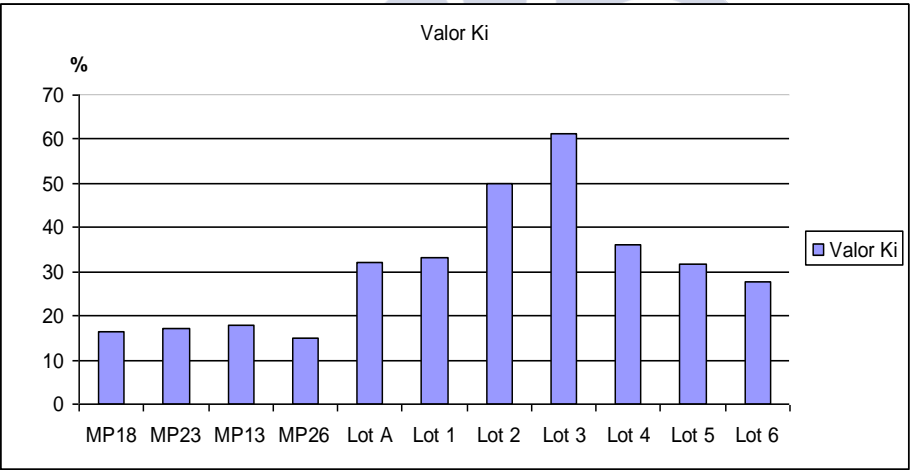


Imagen 173. Valor Ki en materias primas y conservas de sardinilla. Lotes (ver figura 2).

Tabla 73. Principales aminas biógenas (μg amina/g peso fresco) presentes en materias primas y conservas de sardinilla.

Lote	putrescina	tiramina	cadaverina	histamina	agmatina
MP13	11,13	17,17	13,77	0,15	24,25
MP18	6,03	0,60	7,04	0,08	2,36
MP23	4,23	0,54	1,13	0,07	1,36
MP26	2,05	0,51	0,78	0,06	4,68
Lote A	7,59	7,01	16,78	1,73	22,07
Lote 1	1,38	0,49	1,93	0,41	2,32
Lote 2	1,04	0,26	0,38	0,57	1,15
Lote 3	8,04	3,45	12,45	1,21	10,36
Lote 4	3,38	1,08	5,94	1,19	3,88
Lote 5	3,87	0,31	2,16	0,21	0,67
Lote 6	2,13	0,27	0,19	0,31	0,40

El grado de frescura de las materias primas capturadas en Abril presentan unos valores de BVT entre 11 (MP18) y 14 mg N/100 g (MP13), y para el índice de TBA, entre 2,1 (MP23) y 3,0 mg MDA/kg (MP13). Sin embargo, una materia prima muy fresca tendría un valor de BVT inferior a 10 mg N/100 g y el de TBA alrededor de 0,5 mg MDA/kg a los sumo.

Los resultados de Valor Ki también muestran que el lote MP13 posee el valor del 18%, el más alto en relación a los restantes lotes de materias primas, pauta que siguen las aminas biógenas, donde destaca la agmatina sobre tiramina, seguida por cadaverina, putrescina y finalmente histamina. La predominancia de estas aminas junto con los demás parámetros evaluados indican que el lote de materia prima MP13 ha estado en condiciones de almacenamiento y conservación previa a la congelación, a una temperatura inadecuada, probablemente próxima a 10°C durante un tiempo determinado y/o reflejan una heterogeneidad térmica provocada por estratificaciones de temperatura en los contenedores de a bordo. Sin embargo, la mayor concentración de aminas biógenas no implica una correlación con el análisis sensorial, ya que son mecanismos bacterianos psicrófilos, que no se traducen en incrementos de BVT y/o del Valor Ki. Sin embargo el valor obtenido de estos dos últimos parámetros nos indica que la autólisis de la materia prima no ha sido muy agresiva.

En las conservas, el valor de TBA es significativamente más bajo respecto a materias primas, y comparando entre los lotes de conservas, los lotes 1 y 3 presentan los mayores valores (1,1-1,4 mg MDA/kg). El BVT se incrementa en las conservas con relación a las materias primas (30-35 mg N/100g). El TBA desciende gracias a la fase de precocción que elimina los compuestos de degradación autolítica con la pérdida de agua. Por tanto, a igualdad de condiciones en el proceso de conservas, contenidos más elevados de TBA en conservas se presupone una materia prima con grado de frescura más bajo. Por el contrario, el BVT (NH_3 y TMA, principalmente), que también se pierde con el agua exudada durante la precocción, aumenta durante la esterilización por degradación térmica de compuestos nitrogenados naturales termolábiles, por lo cual cuanto más degradado esté la materia prima, la mayor parte de BVT se perderá en la precocción con lo cual, en la conserva quedará menos BVT formado vía térmica. Los lotes 2, 3 y 4 emplearían una materia prima con un grado de deterioro más avanzado con respecto al resto de lotes. Los parámetros BVT y TBA pueden ayudar a conocer el grado de frescura de la materia prima en producto final pero en condiciones estandarizadas y controladas. En este caso, es difícil realizar estimaciones, por lo cual es aconsejable emplear el Valor Ki y aminos biógenos por su termoestabilidad.

En resumen, tras todo lo expuesto y en base a las experiencias con conservas de sardinas realizadas en esta tesis, la materia prima ha tenido un retraso en el proceso de enfriamiento que ha afectado a la frescura de la materia prima y repercute en el producto final, sobre todo el lote MP13. A pesar de que la empresa no transferió la información de relación de materias primas con sus correspondientes conservas, el lote de conservas A y el lote 3 probablemente se hayan elaborado con el lote MP13. En el lote 3, los parámetros de TBA (altos), BVT (bajos) y el mayor Valor Ki confirmaría la teoría del uso del lote de materia prima MP13. Sin embargo, esta relación con el lote problema, Lote A, no está clara, pues ocurre todo lo contrario al lote 3, a excepción de la presencia y cantidad de aminos biógenos. Una explicación podría radicar en la talla de las muestras problema que se han comparado con conservas de referencia de talla adulta, donde ya

se explicó que en base a cambios estacionales y o de talla (edad), estos parámetros de índole intrínseca pueden variar.





CONCLUSIONES





5. CONCLUSIONES.

A continuación se exponen las principales conclusiones obtenidas del desarrollo de este trabajo:

COMPOSICION ELEMENTAL SEGÚN CICLO DE VIDA DE SARDINA

1. El principal cambio observado tiene que ver con la ausencia de la reproducibilidad de su tasa de grasa, cuyo máximo cambia de año en año, y según el mes para una misma talla (entre julio, agosto y septiembre).
2. Se observa una alternancia en la tasa de ácidos grasos omega-3, de EPA y DHA (ambos representan un valor entre el 24 y 30% del total de ácidos grasos, en función de la época del año), este último predomina en primavera, para invertirse en verano, y volver a compensarse hacia final de año.
3. El OTMA del músculo es más elevado en primavera y disminuyendo hacia otoño.

USO DE AGUA DE MAR ENFRIADA (AME) EN JUREL

1. El uso agua de mar refrigerada (AME o CSW) a bordo de los buques artesanales, o durante la descarga en tierra, es un sistema eficaz que preserva la frescura, idoneidad y salubridad del pescado, tal y como nos han mostrado los diferentes análisis realizados sobre esta especie pesquera y con un alto valor biológico a nivel alimentario.
2. El sistema CSW es factible de utilizar a bordo a corto plazo, sin necesidad de realizar obras de infraestructuras costosas, al contrario que el hielo líquido que ya supone inversiones elevadas y modificaciones que obligarían a paradas en tierra. El sistema AME es económico y limpio. Además, a parte de preservar sus cualidades intrínsecas del pescado, minimiza la

presión física del pescado y mejora la efectividad del enfriado, de forma más uniforme y rápida (-1,5 a 0°C) frente al tratamiento con hielo.

3. Para la descarga y posterior trasvase a cajas de menos volumen o venta inmediata, sería preciso unos sistemas de bombeo que separe, sin maltrato, el pescado del agua de los tanques. No es un sistema costoso ni que precise de espacios voluminosos, bien en puerto base o en mercados centrales, y así evitar un peso excesivo en transporte.
4. El jurel es una especie generadora de IMP (por su elevada tasa de mantenimiento en condiciones de refrigeración), que aporta un sabor agradable durante el almacenamiento del pescado.
5. El principal parámetro químico que define la aptitud o límite de idoneidad del jurel es el índice de TBA, independiente del tipo de tratamiento a bordo, y que en condiciones de almacenamiento en hielo alcanza entre 1,3 y 1,5 mg MDA/kg.
6. Las principales aminas indicadoras de alteración en jurel con estas condiciones de almacenamiento, son la Agmatina y la Cadaverina, si bien su tasa es baja, no llega a superar los 2 mg/kg tras 10 días de almacenamiento a temperaturas cercanas a 0°C, pero evidencian que una demora en el tratamiento de frío a bordo sí tiene importancia en su desarrollo posterior.
7. El valor H del jurel (% Hx respecto al total de catabolitos del ATP) ha mostrado ser también un parámetro efectivo en este caso de almacenamiento para esta especie, con un valor estimado del 5% en el músculo.
8. La generación de purinas y 5'-nucleótidos derivados del ATP en jurel almacenado en hielo, tras diferentes tratamientos a bordo, no muestra diferencias significativas.

ENVASADO EN ATMOSFERAS PROTECTORAS (MAP) EN SARDINA

1. La principal causa de rechazo en MAP es la sensación de rancidez, pero la TBA no ha sido determinante como parámetro de frescura, dependiendo de la tasa inicial de grasa (estacional), independiente incluso de la temperatura de refrigeración, pero sí válido como parámetro de alteración. Tasas superiores a 2 mg MDA/kg indican fase avanzada de oxidación lipídica, sensación vinculada a rancidez.
2. Las MAP con tasa intermedia de CO₂ (40-50%) sobre la mezcla total, prolonga la vida útil de tronquitos de sardina de 2-3 días sobre muestras almacenadas en aire. Además, su tasa de formación de aminas biógenas es menor si se compara con muestras almacenadas en aire o con tasas superiores de CO₂, lo cual indica menor desarrollo bacteriano.
3. A menor temperatura de refrigeración de conservación en atmósferas protectoras (MAP), menor es la formación de aminas, y en particular, la formación de CAD y AGM, que son las aminas frecuentes hasta estados avanzados de alteración, independiente de la estacionalidad de la especie. En el límite de aptitud, niveles de 5-8 ppm de estas aminas indican inicio de procesos de alteración.
4. Valor H de 10% y Valor K_i de 40% pueden emplearse como indicadores límite de la frescura de sardina.

ELABORACION DE CONSERVAS: EFECTOS DEL TRATAMIENTO ESTERILIZACIÓN EN SARDINA

1. Los cambios bioquímicos más importantes son experimentados por la fracción grasa durante la elaboración de conservas de sardina; atendiendo a su composición de ácidos grasos (con especial interés a los de la serie omega-3), el tratamiento térmico genera una pérdida significativa entre el 50 y 75% para EPA y DHA, tras 3 meses de maduración.
2. El OTMA se descompone térmicamente en TMA y en menor tasa en DMA, que supone, en el primer caso, hasta un 30% del total BVT en la conserva.
3. TMA, BVT y espermina se ven afectados por el tratamiento térmico, por lo que su utilidad como indicadores de frescura de la materia prima empleada en conserva no es adecuada.
4. Putrescina y Espermidina, en condiciones controladas de fabricación, pueden ser utilizadas por el propio fabricante en el producto final como evaluadores del proceso de fabricación, dada una mejor estabilidad tras el tratamiento de esterilización.
5. De los catabolitos del ATP, el IMP sufre las mayores pérdidas durante las etapas que implican tratamientos térmicos.
6. La relación de Hipoxantina (Valor H) es un buen indicador del proceso en conservas de sardina, para valorar el grado de frescura de la materia prima empleada, pero en condiciones optimizadas. La temperatura de tratamiento de esterilización influyen ligeramente en su tasa final (en torno a 11-13% valor H).
7. La ausencia de aminos alterantes como cadaverina, histamina y agmatina en conserva, indican que la materia prima es de máxima calidad.
8. *Clostridium botulinum* tipo E no sobrevive a tratamientos de conservas con bajos valores de letalidad (F_0 : 1,18).
9. 110°C durante 50 min (F_0 : 2,90) es un binomio tiempo-temperatura mínimo adecuado para conseguir sardinas en conserva de máxima calidad, tanto sensorial como sanitaria respecto a *Clostridium botulinum*.

ELABORACION DE CONSERVAS: EFECTOS DEL PROCESO SEGÚN GRADO DE FRESCURA DE SARDINA.

1. El límite de aceptación y/o frescura para la sardina refrigerada con hielo es de 3 días, con 0,28 $\mu\text{mol Hx/g}$ (1,26 $\mu\text{mol Hx/g}$ seco libre de grasa) y un Valor K_i de 25,64%.
2. La formación de AMP en el producto en conserva es a expensas de sus precursores ATP y ADP.
3. Durante la fase de esterilización se produce una pérdida significativa de IMP (como $\mu\text{mol/g}$), pero que no se refleja en un aumento de Hx más HxR (los cuales se mantienen constantes), lo cual sugiere que el IMP es fácilmente susceptible de ser eliminado por lixiviación con el agua tisular durante este tratamiento térmico.
4. Se observa un aumento lineal del Valor K_i de la sardina refrigerada en hielo; dicho comportamiento se mantiene en el producto en conserva (mayor que en fresco, por la pérdida de IMP), por lo que resulta un parámetro interesante para definir la idoneidad inicial de la materia prima utilizada, estableciendo un 40% como valor de referencia en conserva para delimitar su aptitud sanitaria.
5. *Sardina pilchardus* es una especie formadora de IMP en condiciones de refrigeración.
6. La hipoxantina es un buen parámetro objetivo para evaluar el grado de frescura de la materia prima utilizada en la conserva. Se propone como valor límite del grado de aptitud de la sardina en la conserva 1,5 $\mu\text{mol Hx/g}$ seco libre de grasa o inferior al 10% de Hx (Valor H) respecto al total de catabolitos del ATP.
7. La presencia de aminas biógenas como putrescina y espermidina se pueden emplear como indicadores del grado de alteración de la materia prima usada en la conserva, en condiciones de proceso optimizadas.
8. Las aminas tóxicas o típicas de la alteración del pescado fresco (cadaverina, agmatina e histamina), si su presencia es baja, indicarían unas condiciones de refrigeración de la materia prima adecuada, pero no necesariamente que el pescado

empleado en origen hubiese sido apto sensorialmente. La presencia moderada de estas aminos, por encima de 5 o 8 $\mu\text{g/g}$ en conserva serían indicadores de que la materia prima se hallaba en condiciones de refrigeración pobres.

9. En refrigeración (conservación en hielo, $<2^{\circ}\text{C}$), la amina biógena dominante durante su alteración es la agmatina. Por tanto, un alto valor y dominante de esta amina en conserva, sería indicador de alteración de la materia prima en condiciones refrigeradas.



BIBLIOGRAFIA





6. BIBLIOGRAFIA

Ababouch, L. (2002) HACCP in the fish canning industry. En *Safety and Quality issues in fish processing*, Ed. Bremner, A. Cambridge, pag: 31-34.

Ababouch, L.; Afilal, M.E., Benabdeljelil, H. and Busta, F.F. (1991) Quantitative changes in bacteria, amino acids and biogenic amines in sardine (*Sardina pilchardus*) stored at ambient temperature (25-28°C) and in ice. *Int.J.Food Sic. Technol*, 26(3):297-306.

Ababouch, L.H.; Souibri, L., Rhaliby, K., Ouadhi, O.; Battal, M. and Busta, F.F. (1996) Quality changes in sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice and at ambient temperatures. *Food Microbiol.*, 13:123-132.

Abbas, K.A.; Mohamed, A., Jamilah, B. and Ebrahimian, M. (2008) A review on correlations between fish freshness and pH during cold storage. *American J. Biochem. Biotechnol.*, 4:416-421.

Abida, J., Rayees, B., and Masoodi, F. A. (2014). Pulsed light technology: a novel method for food preservation. *International Food Research Journal*, 21(3).

Addis, P., Secci, M., Locci, I. and Cau, A. (2012) Harvesting, handling practices and processing of bluefin tuna captured in the trap fishery: possible effects on the flesh quality. *Collect. Vol. Sci. Pap., ICCAT* 67(1):390-398.

Adepoju, M. A., Omitoyin, B. O., Mohan, C. O., and Zynudheen, A. A. (2017). Heat penetration attributes of milkfish (*Chanos chanos*) thermal processed in flexible pouches: a comparative study between steam application and water immersion. *Food science & nutrition*, 5(3):521-524.

AENOR (2010) Análisis sensorial. Normas UNE. 2ª Edición. AENOR EDICIONES. Madrid

Aflaki, F., Anoosheh, N., and Hosseini, S. V. (2015a). Effect of Gamma Radiation on the Chemical Quality of Refrigerated Salmon

Fillets. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 1396.

Aflaki, F., Ghoulipour, V., Saemian, N., Shiebani, S., and Salahinejad, M. (2017). Chemometrics approaches to monitoring of biogenic amines changes in three fish species. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 26(1):43-53.

Aflaki, F., Ghoulipour, V., Saemian, N., Shiebani, S., and Tahergorabi, R. (2015b). Effects of E-beam irradiation and vacuum packaging on biogenic amines formation in common carp (*Cyprinus carpio*) fillets. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(9):2074-2079.

Afsharmanesh, S.; Peighambari, Y.; Shabanpure, B. and Hosseini, A.R. (2013) Survey of quality control in whole Yellowfin Tuna (*Thunnus albacores*) using relation of biogenic amines with psychrophilic bacteria load during frozen storage. *World J. Fish Mar. Sci.*, 5:527-532.

Agustsson, I. and Strom, A.R. (1981) Biosynthesis and turnover of trimethylamine oxide in the teleost cod, *Gadus morhua*. *J. Biol. Chem.*, 256:8045-8049.

Ahlstrom, E.H. (1960). Synopsis on the biology of the Pacific sardine (*Sardinops sagax caerulea*). *FRQ Fish. Biol.Synops.*, 17:415-451

Aksnes, A. and Brekken, B. (1988) Tissue degradation, amino acid liberation and bacterial decomposition of bulk stored capelin. *J.Sci Food Agric.*, 45:53-60.

Alasalvar, C., Taylor, K. D. A., Öksüz, A., Garthwaite, T., Alexis, M. N., and Grigorakis, K. (2001). Freshness assessment of cultured sea bream (*Sparus aurata*) by chemical, physical and sensory methods. *Food Chemistry*, 72(1):33-40.

Albrecht-Ruiz, M., and Salas-Maldonado, A. (2015). Chemical composition of light and dark muscle of Peruvian anchovy (*Engraulis ringens*) and its seasonal variation. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 24(2):191-196.

Alfaro, B.; Hernández, I.; Baliño-Zuazo, L. and Barranco, A. (2013) Quality changes of atlantic mackerel fillets (*Trachurus*

trachurus) packed in a modified atmosphere at different storage temperatures. *J.Sci. Food Agric.*, 93:2179-2187.

Alfonzo, A., Martorana, A., Guarrasi, V., Barbera, M., Gaglio, R., Santulli, A., and Francesca, N. (2017). Effect of the lemon essential oils on the safety and sensory quality of salted sardines (*Sardina pilchardus* Walbaum 1792). *Food Control*, 73:1265-1274

Alghazeer, R., Saeed, S., and Howell, N. K. (2008). Aldehyde formation in frozen mackerel (*Scomber scombrus*) in the presence and absence of instant green tea. *Food Chemistry*, 108(3):801-810.

Ali, A., Sudhir, B., Gopal, S., and Teralandur, K. (2005). Effect of heat processing on the texture profile of canned and retort pouch packed oil sardine (*Sardinella longiceps*) in oil medium. *Journal of Food Science*, 70(5).

Alinasabhematabadi, L. (2015). *Protein oxidation in Atlantic mackerel (Scomber scombrus) during chilled and frozen storage*. Tesis doctoral, NTNU.

Al-Jasser, M. S., and Al-Jasass, F. M. (2014). Study the chemical, physical changes and microbial growth as quality measurement of fish. *Annual Research & Review in Biology*, 4(9):1406-.

Altintzoglou, T.; Einarsdottir, G.; Valsdottir, T.; Schelvis, R.; Skåra, T. and Luten, J. (2010) A voice-of-consumer approach in development of new seafood product concepts. *J.Aqua.Food Prod.Technol.*, 19(2):130-145.

Alvarez-Prado, F. (2001) Crecimiento diario de *Sardina pilchardus* Walbaum, 1792 (Pisces: Clupeidae) y su aplicación al estudio de procesos de reclutamiento. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.

Amerine, M. A., Pangborn, R. M., and Roessler, E. B. (1965). Principles of sensory evaluation of food. Academic Press, London

Anderson, L., Dibble, M.V., Mitchell, H.S. and Rynbergen, H.J. (1994) Nutrición y nutrientes. Edicions Bellaterra, Barcelona.

Andrade, S. C. S., Mársico, E. T., Franco, R. M., Mano, S. B., Conte, C. A., Freitas, M. Q., and Cruz, A. G. (2015). Effect of Storage Temperature at the Quality Index Method Scheme and Shelf-Life

Study of Mullet (*Mugil platanus*). *Journal of Food Quality*, 38(1):60-70.

André, S., Zuber, F. and Remize, F. (2013). Thermophilic spore-forming bacteria isolated from spoiled canned food and their heat resistance. Results of a French ten-year survey. *Int. J. Food Microbiol.*, 165:134-143.

ANFACO (2002) II Conferencia Mundial de la Sardina. Vigo.

ANFACO (2016) Comercio exterior de productos del mar y de la acuicultura español. *Industria conservera*, 120:24-33.

Ansari, I. A., and Datta, A. K. (2003). An overview of sterilization methods for packaging materials used in aseptic packaging systems. *Food and Bioprocess Processing*, 81(1):57-65.

Ansari, I. A., and Datta, A. K. (2003). An overview of sterilization methods for packaging materials used in aseptic packaging systems. *Food and Bioprocess Processing*, 81(1):57-65.

Anthoni, U., Børresen, T., Christophersen, C., Gram, L., and Nielsen, P. H. (1990). Is trimethylamine oxide a reliable indicator for the marine origin of fish?. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 97(3):569-571.

Antonacopoulos, N., and Vyncke, W. (1989). Determination of volatile basic nitrogen in fish: A third collaborative study by the West European Fish Technologists' Association (WEFTA). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 189(4):309-316.

Anzaldúa Morales, A. (1994). La Evaluación Sensorial de los Alimentos en teoría y la práctica. Acribia, Zaragoza.

AOAC (1995) *Official Methods of Analysis AOAC Int.* 16th ed., AOAC Int. (Eds.), Arlington, Virginia. Vol 2.

AOAC (2000) Method 969.33. En: *Official Methods of Analysis AOAC Int.* AOAC Int. (Eds.), Gaithersburg.

Arena, M. E., and Manca de Nadra, M. C. (2001). Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *Journal of Applied Microbiology*, 90(2):158-162.

Ares, G., Deliza, R., Barreiro, C., Giménez, A., and Gámbaro, A. (2010). Comparison of two sensory profiling techniques based on consumer perception. *Food Quality and Preference*, 21(4):417-426.

Arvanitoyannis, I. S., and Kotsanopoulos, K. V. (2012). Smoking of fish and seafood: history, methods and effects on physical, nutritional and microbiological properties. *Food and Bioprocess Technology*, 5(3):831-853.

Ashie, I. N. A., Smith, J. P., Simpson, B. K., and Haard, N. F. (1996). Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36(1-2):87-121.

Ashton, I.P. (2002) Understanding lipid oxidation in fish. En *Safety and Quality issues in fish processing*, Ed. Bremner, A. Cambridge, pag: 254-286.

Aubourg, S. (2001a) Damage detection in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) during chilled storage. *J.Am.Oil Chem.Soc.*, 78:857-862.

Aubourg, S. P. (1998). Lipid changes during long-term storage of canned tuna (*Thunnus alalunga*). *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 206(1):33-37.

Aubourg, S. P. (2001b). Loss of quality during the manufacture of canned fish products. *Food Science and Technology International*, 7(3):199-215.

Aubourg, S. P., Losada, V., Gallardo, J. M., Miranda, J. M., and Barros-Velázquez, J. (2006). On-board quality preservation of megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis*) by a novel ozonised-slurry ice system. *European Food Research and Technology*, 223(2):232-237.

Aubourg, S. P., Quiral, V., Larraín, M. A., Rodríguez, A., Gómez, J., Maier, L., and Vinagre, J. (2007). Autolytic degradation and microbiological activity in farmed Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during chilled storage. *Food Chemistry*, 104(1):369-375.

Aubourg, S., Medina, I., Gallardo, J. y Pérez-Martín, R. (1995) Efecto del enlatado en aceite y salmuera y su posterior almacenamiento sobre lípidos de la bacoreta (*Euthynnus alletteratus*). *Grasas y Aceites*, 46:77-84.

Aubourg, S.P. (1993) Review: interaction of malondialdehyde with biological molecules- new trends about reactivity and significance. *Int.J. Food Sci.Technol.*, 28(4):323-335.

Aubourg, S.P. and Gallardo, J.M. (2005a) Effect of brine freezing on the rancidity development during the frozen storage of small pelagic fish species. *Eur.Food Res.Technol.*, 220:107-112.

Aubourg, S.P., Lehmann, I. and Gallardo, J.M. (2002) Effect of previous chilled storage on rancidity development in frozen horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *J.Sci.Food Agric.*, 82:1764-1771.

Aubourg, S.P., Piñeiro, C. and González, M.J. (2004) Quality loss related to rancidity development during frozen storage of horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *JAOCs*, 81(7):671-678.

Aubourg, S.P., Piñeiro, C., Gallardo, J.M. and Barros-Velázquez, J. (2005c) Biochemical changes and quality loss during chilled storage of farmed turbot (*Psetta maxima*). *Food Chem.*, 90:445-452.

Aubourg, S.P., Rodríguez, A. and Gallardo, J.M. (2005d) Rancidity development during frozen storage of mackerel (*Scomber scombrus*): effect of catching season and commercial presentation. *Eur.J.Lipid Sci.Technol.*, 107:316-323.

Auerswald, L., Morren, C., and Lopata, A. L. (2006). Histamine levels in seventeen species of fresh and processed South African seafood. *Food Chemistry*, 98(2):231-239.

Awuah, G. B., Ramaswamy, H. S., and Economides, A. (2007). Thermal processing and quality: principles and overview. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46(6):584-602.

Baird-Parker, A. C., and Freame, B. (1967). Combined effect of water activity, pH and temperature on the growth of *Clostridium botulinum* from spore and vegetative cell inocula. *Journal of Applied Microbiology*, 30(3):420-429.

Baixas-Noguerras, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, T. and Vidal-Carou, M.C. (2002) Chemical and sensory changes in Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*) under refrigeration (6-8°C) and stored in ice. *J.Agric.Food Chem.*, 50:6504-6510.

Baker, D.A., and Genigeorgis, C. (1990). Predicting the safe storage of fresh fish under modified atmospheres with respect to *Clostridium botulinum* toxigenesis by modeling length of the lag phase of growth. *Journal of Food Protection*, 53(2):131-140.

Bandarra, N.M, Batista, I., Nunes, M.L., Empis, J.M. and Christie, W.W. (1997) Seasonal changes in lipid composition of sardine (*Sardina pilchardus*). *J. Food Sci.*, 62:40-42.

Bandarra, N.M., Batista, I., Nunes, M.L. and Empis, J.M. (2001) Seasonal variation in the chemical composition of horse-mackerel (*Trachurus trachurus*). *Eur. Food Res. Technol.*, 212:535-539.

Banerjee, R., Verma, A. K., and Siddiqui, M. W. (2017). Methods and Their Applications for Measuring and Managing Lipid Oxidation: Meat, Poultry, and Seafood Products. En *Natural Antioxidants*. Apple Academic Press. pag.: 223-280

Baranowski, J.D., Frank, H.A., Brust, P.A., Chongsiriwatana, M. and Premaratne, R.J. (1990) Decomposition and histamine content in Mahimahi (*Coryphæna hippurus*). *J.Food Prot.*, 53(3):217-222.

Barat, J.M., Gil, L., García-Breijo, E., Aristoy, M.C., Toldrá, F., Matínez-Mañez, R. and Soto, J. (2008) Freshness monitoring of sea bream (*Sparus aurata*) with a potentiometric sensor. *Food Chem.*, 108:681-688.

Barbosa, A. and Vaz-Pires, P. (2004) Quality Index Method (QIM): development of a sensorial scheme for common octopus (*Octopus vulgaris*). *Food Control*, 15(3):161-168.

Barbosa, R. G., Gonzaga, L. V., Lodetti, E., Olivo, G., Costa, A. C. O., Aubourg, S. P., and Fett, R. (2017). Biogenic amines assessment during different stages of the canning process of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *International Journal of Food Science & Technology*.

Barbosa-Canovas, G.V., Pothakamury, U.R., Paloum, E. and Swanson, B.G. (1999) Conservación no térmica de los alimentos. Ed Acribia. Zaragoza.

Barros-Velázquez, J., Gallardo, J.M., Calo, P. and Aubourg, S.P. (2008) Enhanced quality and safety during on-board chilled storage of fish species captured in the Grand Sole North Atlantic fishing bank. *Food Chem.*, 106:493-500.

Beltrán, A. and Moral, A. (1990) Gas chromatographic estimation of oxidative deterioration in sardine during frozen storage. *Lebens.Wis. Technol.*, 23(6):499-504.

Ben-Gigirey, B., Vieites Baptista de Sousa, J. M., Villa, T. G., and Barros-Velázquez, J. (1999). Histamine and cadaverine production by bacteria isolated from fresh and frozen albacore (*Thunnus alalunga*). *Journal of Food Protection*, 62(8):933-939.

Benguendouz, A., Boudroua, K., Bouterfa, A., Belabes, M., Bekada, A., Sioriki, E. and Zabetakis, I. (2016) Fatty acid profile and assessment of heavy metals content of *Sardina pilchardus* captured in de Algerian coast. *Iranian J. Fish. Sci.*, 16:1021-1029.

Benjakul, S., Seymour, T. A., Morrissey, M. T., and An, H. (1997). Physicochemical changes in Pacific whiting muscle proteins during iced storage. *Journal of Food Science*, 62(4):729-733.

Bennett, R., and Hamilton, M. (1986). Consumer acceptability of cod and whiting after chilled storage and freezing and thawing. *International Journal of Food Science & Technology*, 21(3):311-317.

Berendsen, E.M., Zwietering, M.H., Kuipers, O.P. and Wells-Bennik, M.H.J. (2015) Two distinct groups within the *Bacillus subtilis* group display significantly different spore heat resistance properties. *Food Microbiol.*, 45:18-25.

Bertram, H. C., Kristensen, M., Østdal, H., Baron, C. P., Young, J. F., and Andersen, H. J. (2007). Does oxidation affect the water functionality of myofibrillar proteins?. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6):2342-2348.

Beschta, R. L., Bilby, R. E., Brown, G. W., Holtby, L. B., and Hofstra, T. D. (1987). CHAPTER SIX Stream Temperature and Aquatic Habitat: Fisheries and Forestry Interactions.

Besteiro, I. (2000) Los parásitos del pescado. En *La manipulación a bordo de pescado de la costera artesanal*. Eds Pascual, C y Díaz, M. Cofradía de Pescadores Santiago Apóstol, Viveiro. pag:135-142.

Besteiro, I.; Rodriguez, C.J.; Tilve-Jar, C. and Pascual, C. (1996) Análisis sensorial descriptivo del anchoado del boquerón. *Alimentaria*, 274: 73-79.

Besteiro, I.; Rodriguez, C.J.; Tilve-Jar, C. and Pascual, C. (2000) Selection of attributes for the sensory evaluation of anchovies during ripening process. *J. Sensory Studies*, 15:65-77.

Bhangare, R. C., Sahu, S. K., and Pandit, G. G. (2015). Nitrosamines in seafood and study on the effects of storage in refrigerator. *Journal of Food Science and Technology*, 52(1):507-513.

Biji, K. B., Ravishankar, C. N., Venkateswarlu, R., Mohan, C. O., and Gopal, T. S. (2016). Biogenic amines in seafood: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 53(5):2210-2218.

Bilgin, B., and Gençcelep, H. (2015). Determination of biogenic amines in fish products. *Food Science and Biotechnology*, 24(5):1907-1913.

Bjornsdottir, K., Bolton, G. E., McClellan-Green, P. D., Jaykus, L. A., and Green, D. P. (2009). Detection of gram-negative histamine-producing bacteria in fish: a comparative study. *Journal of Food Protection*, 72(9):1987-1991.

Black, D. and Love, R.M. (1988) Estimating the carbohydrate reserve in fish. *J. Fish Biol.*, 32:335-340.

Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and physiology*, 37(8):911-917.

BOE (1984) Real Decreto 1521/1984, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria de los Establecimientos y Productos de la Pesca y Acuicultura con Destino al Consumo Humano.

Bogdanovic, T., Simat, V., Frka-Roic, A. and Markovic, K. (2012) Development and application of Quality Index Method scheme in a shelf-life study of wild and fish farm affected bogue (*Boops boops*, L.). *J. Food Sci.*, 77(2):S99-S106.

Borgstrom, G. (2012). *Fish As Food*. Vol. 4: Processing. Elsevier. Amsterdam

Botta, J.R. (1995) *Evaluation of seafood freshness quality*. VCH Publishers, New York, 180 pag.

Bottero, M. T., Civera, T., Ventura, C., and Pilla, N. D. (1998). Qualitative and sanitary evaluations of canned pilchards. *Industrie Alimentari (Italy)*.

Bottini, A.D., Puig, J.V. and Cantillo, A.G. (2001) Physical and chemical evaluation of sardine (*Sardinella aurita*) during ice storage. *Rev.Cien.Fac.Cien.Vet.*, 11:22-29.

Bouderoua, K.; Mourot, J.; Benmehdi-Tabet-Aoull, F. and Selselet-Attou, G. (2011) The effects of season and site of catch on morphometric characteristics, mineral content, and fatty acids of sardines (*Sardina pilchardus*) caught on the Algerian Coast. *J.Aqua.Food Prod.Technol.*, 20(4):412-420

Boziaris, I. S., and Parlapani, F. F. (2017). Specific Spoilage Organisms (SSOs) in Fish. En *The Microbiological Quality of Food*. pag:61-98.

Brea-Fernández, M.D.; Rodríguez-Vázquez, C.J.; Corcuera, M. and Pascual, C. (2012) Composición de ácidos grasos de especies descarte de la flota litoral gallega. *Foro Rec.Mar.Ac.Rías Gal.*, 14:171-179.

Bremner, A., Swings, S., and John, D. (2002) Understanding the concepts of quality and freshness in fish. En *Safety and Quality issues in fish processing*, Ed. Bremner, A. Cambridge, pag: 163-172.

Bremner, H.A. (1985) A convenient, easy-to-use system for estimating the quality of chilled seafood. *Fish Proces. Bull.*, 7:59-70.

Bulushi, I. A., Poole, S., Deeth, H. C., and Dykes, G. A. (2009). Biogenic amines in fish: roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation—a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(4):369-377.

Burguess, G.H.O., Cutting, C.L., Lovern, J.A. y Waterman, J.J. (1971) *El pescado y las industrias derivadas de la pesca*. ACRIBIA, Zaragoza.

Burns, G., Ke, P. and Irvine, B. (1985) Objective procedure for fish freshness evaluation based on nucleotide changes using HPLC system. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.*, 1373:1-39.

Burt, J.R., Gibson, D.M., Jason, A.C., and Sanders, H.R. (1976) Comparison of methods of freshness assessment of wet fish. II. Instrumental and chemical assessment of boxed experimental fish. *Journal of Food Technology*, 11:73-89.

Burt, S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review, *International Journal of Food Microbiology* 94:223–253.

Byun, Y., Bae, H. J., Cooksey, K., and Whiteside, S. (2010). Comparison of the quality and storage stability of salmon packaged in

various retort pouches. *LWT-Food Science and Technology*, 43(3):551-555.

Cai, P., Harrison, M. A., Huang, Y. W. and Silva, J. L. (1997). Toxin production by *Clostridium botulinum* type E in packaged channel catfish. *Journal of Food Protection*, 60(11):1358-1363.

Cakli, S., Kilinc, B., Cadum, A. and Tolasa, S. (2006a) Effects of using slurry ice on the microbiological, chemical and sensory assessments of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored at 4°C. *Eur.Food Res.Technol.*, 222:130-138.

Cakli, S., Kilinc, B., Dincer, T. and Tolasa, S. (2006b) Effects of using slurry ice during transportation on the microbiological, chemical, and sensory assessments of aquacultured sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) stored at 4°C. *Cri.Rev.Food Sci.Nut.*, 46:453-458.

Calanche, J.; Samayoa, S.; Alonso, V.; Provincial, L.; Roncales, R. and Beltrán, J.A. (2013) Assessing the effectiveness of a cold chain for fresh fish salmon (*Salmo salar*) and sardine (*Sardina pilchardus*) in a food processing plant. *Food Control*, 33(1):126-135.

Cammack, R.; Joannou, C.L.; Cui, X.Y.; Torres Martinez, C.; Maraj, S.R. and Hughes, M.N. (1999) Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1411(2-3):475-488.

Campus, M. (2010). High pressure processing of meat, meat products and seafood. *Food Engineering Reviews*, 2(4):256-273.

Campus, M., Bonaglini, E.; Cappuccinelli, R., Porcu, M.C.; Tonelli, R. and Roggio, T. (2011) Effect of modified atmosphere packaging on quality index method (QIM) scores of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) at low and abused temperatures. *J. Food Sci.*, 76(3):S185-S191.

Cann-Moisan, C., Caroff, J., Hebert, P. and Barthelemy, L. (1989) Comparative study of energetic nucleotides in young and adult trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture*, 81:91-

Capel, J.C (1985) La sardina. Un tesoro de nuestra mar. Ed. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.

Caponio, F., Lestingi, A., Summo, C., Bilancia, M.T. and Laudadio, V. (2004) Chemical characteristics and lipid fraction

quality of sardines (*Sardina pilchardus* W.): influence of sex and length. *J. Appl. Ichthyol.*, 20:530-535.

Cardoso, C; Lourenço, H.; Costa, S.; Gonçalves, S and Nunes, M.L. (2013) Survey into the seafood consumption preferences and patterns in the portuguese population. Gender and regional variability. *Appetite*, 64:20-31.

Careche, M. and Barroso, M. (2009) Instrumental texture measurement. In *Fishery Products- Quality, Safety and Authenticity*, Eds. Rehbein, H. and Oehlenschläger, J. Wiley-Blackwell, Oxford, pag:214-239.

Carpenter, R. P., Lyon, D. H., Hasdell, T. A., and Aguilera, M. A. (2002). Análisis sensorial en el desarrollo y control de la calidad de alimentos. Acribia. Zaragoza

Carrera, P., and Porteiro, C. (2003). Stock dynamic of the Iberian sardine (*Sardina pilchardus*, W.) and its implication on the fishery off Galicia (NW Spain). *Scientia Marina*, 67(S1):245-258.

Casas, B., Varela, M., Canle, M., González, N. and Bode, A. (1997) Seasonal variations of nutrients, seston and phytoplankton, and upwelling intensity off La Coruña (NW Spain). *Estuar.Coas.Shelf Sci.*, 44:767-778.

Castell, C.H., Smith, B., and Dyer, W.J. (1974). Simultaneous measurements of trimethylamine and dimethylamine in fish, and their use for estimating quality of frozen-stored gadoid fillets. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 31(4):383-389.

Celik, M. (2008). Seasonal changes in the proximate chemical compositions and fatty acids of chub mackerel (*Scomber japonicus*) and horse mackerel (*Trachurus trachurus*) from the north eastern Mediterranean Sea. *International journal of Food Science & Technology*, 43(5):933-938.

Chaijan, M., Benjakul, S., Visessanguan, W., and Faustman, C. (2006). Changes of lipids in sardine (*Sardinella gibbosa*) muscle during iced storage. *Food Chemistry*, 99(1):83-91.

Chaijan, M., Benjakul, S., Visessanguan, W., and Faustman, C. (2006). Changes of lipids in sardine (*Sardinella gibbosa*) muscle during iced storage. *Food Chemistry*, 99(1):83-91.

Chaijan, M., Benjakul, S., Visessanguan, W., and Faustman, C. (2005). Changes of pigments and color in sardine (*Sardinella gibbosa*) and mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) muscle during iced storage. *Food Chemistry*, 93(4):607-617.

Chamanara, V., Shabanpour, B., Gorgin, S. and Khomeiri, M. (2012) An investigation on characteristics of rainbow trout coated using chitosan assisted with thyme essential oil. *Int. J. Biological Macromolecules*, 50(3):540-544.

Chan, S. T., Yao, M. W., Wong, Y. C., Wong, T., Mok, C. S., and Sin, D. W. (2006). Evaluation of chemical indicators for monitoring freshness of food and determination of volatile amines in fish by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *European Food Research and Technology*, 224(1):67.

Cheftel, H. (1953) El valor alimenticio de las conservas. Unión de Fabricantes de Conservas de Galicia. Boletín nº2, pag 108.

Chen, H. C., Kung, H. F., Chen, W. C., Lin, W. F., Hwang, D. F., Lee, Y. C., and Tsai, Y. H. (2008). Determination of histamine and histamine-forming bacteria in tuna dumpling implicated in a food-borne poisoning. *Food Chemistry*, 106(2):612-618.

Cheng, J. H., Dai, Q., Sun, D. W., Zeng, X. A., Liu, D., and Pu, H. B. (2013). Applications of non-destructive spectroscopic techniques for fish quality and safety evaluation and inspection. *Trends in food science & technology*, 34(1):18-31.

Cheng, J. H., Sun, D. W., Zeng, X. A., and Liu, D. (2015). Recent advances in methods and techniques for freshness quality determination and evaluation of fish and fish fillets: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(7):1012-1225.

Chinivasagam, H. N., Bremner, H. A., Wood, A. F., and Nottingham, S. M. (1998). Volatile components associated with bacterial spoilage of tropical prawns. *International Journal of Food Microbiology*, 42(1-2):45-55.

Chitra, R.S. and Radhakrishnan, C.K. (2013) Seasonal variation in the fatty acid composition of *Sardinella longiceps* and *Sardinella fimbriata*: Implications for nutrition and pharmaceutical industry. *Indian J. Geo-Mar. Sci.*, 42:206-210.

Chong, C. Y., Bakar, F. A., Rahman, R. A., Bakar, J., and Zaman, M. Z. (2014). Biogenic amines, amino acids and microflora changes in Indian mackerel (*Rastrellinger kanagurta*) stored at ambient (25–29 C) and ice temperature (0 C). *Journal of Food Science and Technology*, 51(6):1118-1125.

Chouliara, I., Savvaidis, I. N., Riganakos, K., and Kontominas, M. G. (2005). Shelf-life extension of vacuum-packaged sea bream (*Sparus aurata*) fillets by combined γ -irradiation and refrigeration: microbiological, chemical and sensory changes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(5):779-784.

Clifford, M.N., Walker, R., Wright, J., Hardy, R. and Murray, C.K. (1989) Studies with volunteers on the role of histamine in suspected scombrototoxicosis. *J.Sci.Food Agric.*, 47:365-375

Cockey, R. R., and Tatro, M. C. (1974). Survival studies with spores of *Clostridium botulinum* type E in pasteurized meat of the blue crab *Callinectes sapidus*. *Applied microbiology*, 27(4):629-633.

Cortesi, M. L., Panebianco, A., Giuffrida, A., and Anastasio, A. (2009). Innovations in seafood preservation and storage. *Veterinary Research Communications*, 33(1):15-23.

Costalago, D. and Palomera, I. (2014) Feeding of European pilchard (*Sardina pilchardus*) in the northwestern Mediterranean: from late larvae to adults. *Sci. Mar.*, 78:41-54.

Covington, M. B. (2004). Omega-3 fatty acids. *Atlantic*, 1(2.0).

Cozzolino, D., and Murray, I. (2012). A review on the application of infrared technologies to determine and monitor composition and other quality characteristics in raw fish, fish products, and seafood. *Applied Spectroscopy Reviews*, 47(3):207-218.

Culley, M. (1971) The Pilchard. Biology and Exploitation. Pergamon Press. Exeter.

Cunha, S. C., Cunha, C., Ferreira, A. R., and Fernandes, J. O. (2012). Determination of bisphenol A and bisphenol B in canned seafood combining QuEChERS extraction with dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(8):2453-2463.

Cyprian, O.O.; Sveinsdottir, K.; Magnusson, H. and Martinsdottir, E. (2008) Application of Quality Index Method (QIM) scheme and effects of short-time temperature abuse in shelf life study of fresh water arctic char (*Salvelinus alpinus*). *J. Aqua. Food Prod. Technol.*, 17(3):303-321.

Dalgaard, P., Gram, L. and Huss, H.H. (1993). Spoilage and shelf life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *Int. J. Food Microbiol.*, 19:283-294.

Dalgaard, P., Mejlholm, O., Christiansen, T.J., and Huss, H.H. (1997). Importance of *Photobacterium phosphoreum* in relation to spoilage of modified atmosphere-packed fish products. *Letters in Applied Microbiology*, 24(5):373-378.

Davidek, J., Velišek, J., and Janíček, G. (1972). Stability of inosinic acid, inosine and hypoxanthine in aqueous solutions. *Journal of Food Science*, 37(5):789-790.

Davies, A.R. (2001) Envasado del pescado y productos de la pesca en atmósferas modificadas. En *Tecnología del Procesado del Pescado*. Ed. Hall, G.M. Acribia, Zaragoza. Pag:209-234.

Davis, L., Goodwin, L., Smith, G. and Hole, M. (1993) Lipid oxidation in salted-dried fish - the effect of temperature and light on the rate of oxidation of a fish-oil. *J. Sci. Food Agric.*, 62:355-359.

De Leonardis, A., and Macciola, V. (2004). A study on the lipid fraction of Adriatic sardine filets (*Sardina pilchardus*). *Molecular Nutrition & Food Research*, 48(3):209-212.

de Ross, B., Sneddon, A. and Macdonald, H. (2012). Fish as a dietary source of healthy long chain n-3 polyunsaturated fatty acids (LC n-3 PUFA) and vitamin D. *FHIS Food & Health Innovation Service*, Junio 2012.

DeAngelis, D. L., Trexler, J. C., Cosner, C., Obaza, A., and Jopp, F. (2010). Fish population dynamics in a seasonally varying wetland. *Ecological Modelling*, 221(8):1131-1137.

Debevere, J., Devlieghere, F., von Sprundel, P. and de Meulenaar, B. (2001) Influence of acetate and CO₂ on the TMAO-reduction reaction by *Shewanella baltica*. *Int. J. Food Microbiol.*, 68:115-123.

Decker, E. A., and Hultin, H. O. (1990b). Nonenzymic catalysts of lipid oxidation in mackerel ordinary muscle. *Journal of Food Science*, 55(4):951-953.

Decker, E. A., and Welch, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 38(3):674-677.

Decker, E.A., and Hultin, H. O. (1990a). Factors influencing catalysis of lipid oxidation by the soluble fraction of mackerel muscle. *Journal of Food Science*, 55(4):947-950.

del Castillo, J. M. S. (Ed.). (2006). *Nutrición básica humana*. Vol. 91. Universitat de València.

del Rio, B., Redruello, B., Linares, D. M., Ladero, V., Fernandez, M., Martin, M. C., and Alvarez, M. A. (2017). The dietary biogenic amines tyramine and histamine show synergistic toxicity towards intestinal cells in culture. *Food Chemistry*, 218:249-255.

Delbarre-Ladrat, C., Chéret, R., Taylor, R., and Verrez-Bagnis, V. (2006). Trends in postmortem aging in fish: understanding of proteolysis and disorganization of the myofibrillar structure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(5):409-421.

Dhaouadi, A., Monser, L., Sadok, S., and Adhoum, N. (2007). Validation of a flow-injection-gas diffusion method for total volatile basic nitrogen determination in seafood products. *Food Chemistry*, 103(3):1049-1053.

di Natale, C. and Olafsdóttir, G. (2009) Electronic nose and electronic tongue. En: *Fishery Products: quality, safety and authenticity*. Ed Rehbein, H. and Oehhlenschläger, J., Wiley-Blackwell, Oxford. Pag: 105-126.

Diao, M. M., André, S., & Membré, J. M. (2014). Meta-analysis of D-values of proteolytic *Clostridium botulinum* and its surrogate strain *Clostridium sporogenes* PA 3679. *International Journal of Food Microbiology*, 174:23-30.

Dickerson Jr, R. W., and Berry Jr, M. R. (1974). Temperature profiles during commercial pasteurization of meat from the blue crab. *Journal of Milk and Food Technology*, 37(12):618-621.

Dickerson Jr, R. W., and Berry Jr, M. R. (1976). Heating curves during commercial cooking of the blue crab. *Journal of Milk and Food Technology*, 39(4):258-262.

Digre, H., Erikson, U., Aursand, I.G., Gallart-Jornet, L., Mismi, E. and Rustad, T. (2011) Rested and stressed farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*) chilled in ice or slurry and effects on quality. *J.Food Sci.*, 76(1):89-100.

Digre, H., Standal, I. B., Kristinova, V., Hyldig, G., Undeland, I., Rustad, T., and Mozuraityte, R. (2016). Preserving the positive health effects in innovative pelagic fish products through the value chain (ProHealthPelagic).

Dobson, G. P., Parkhouse, W. S., and Hochachka, P. W. (1987). Regulation of anaerobic ATP-generating pathways in trout fast-twitch skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 253(1):R186-R194

Doeun, D., Shin, H. S., and Chung, M. S. (2016). Effects of storage temperatures, vacuum packaging, and high hydrostatic pressure treatment on the formation of biogenic amines in Gwamegi. *Applied Biological Chemistry*, 59(1):51-58.

Duran, A., Erdemli, U., Karakaya, M., and Yilmaz, M. (2008). Effects of slaughter methods on physical, biochemical and microbiological quality of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and mirror carp *Cyprinus carpio* filleted in pre-, in-or post-rigor periods. *Fisheries Science*, 74(5):1146-1156.

Durance, T.D. (1997) Improving canned food quality with variable retort temperature processes. *Trends in Food Science and Technology*, 8(4):113-118.

Durmuş, M., Polat, A., ÖZ, M., Ozogul, Y., and Ucak, I. (2014). The effects of seasonal dynamics on sensory, chemical and microbiological quality parameters of vacuum-packed sardine (*Sardinella aurita*). *Journal of Food & Nutrition Research*, 53(4):344-352

Duun, A. S., and Rustad, T. (2007). Quality changes during superchilled storage of cod (*Gadus morhua*) fillets. *Food Chemistry*, 105(3):1067-1075.

Dyer, W.J. (1959). Report on trimethylamine in fish. *Journal of the AOAC*, 42(2):292-294.

Edmunds, W.J. and Eitenmiller, R.R. (1975) Effect of storage time and temperature on histamine content and histidine decarboxylase activity of aquatic species. *J.Food Sci.*, 40:516-519.

Ehira, S. (1976). Biochemical study on the freshness of fish. *Bull.Tokai Reg.Fish.Res.Lab.*, 88:1-5.

Ehira, S. and Uchiyama, H. (1987) Determination of fish freshness using the K value and comments on some other biochemical changes in relation to freshness. In *Seafood Quality Determination*. Ed. Kramer and Liston. Elsevier Science Publishers. Amsterdam pag: 185-209.

Einen, O., and Thomassen, M. S. (1998). Starvation prior to slaughter in Atlantic salmon (*Salmo salar*): II. White muscle composition and evaluation of freshness, texture and colour characteristics in raw and cooked fillets. *Aquaculture*, 169(1-2):37-53.

Eitenmiller, R.R., Wallis, J.W., Orr, J.H. and Phillips, R.D. 1981. Production of histidine decarboxylase and histamine by *Proteus morganii*. *J. Food Protect.*, 44:815-820.

Eklund, M.W., Peterson, M.E., Paranjpye, R., and Pelroy, G.A. (1988). Feasibility of a heat-pasteurization process for the inactivation of nonproteolytic *Clostridium botulinum* types B and E in vacuum-packaged, hot-process (smoked) fish. *Journal of Food Protection*, 51(9):720-726.

El Marrakchi, A, Bennour, M, Bouchriti, N, Hamama, A and Tagafatit, H. (1990). Sensory, chemical and microbiological assessments of Moroccan sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice. *J.Food Protect.*, 53:600-605.

Eldaly, E. A., Abd El Salam, E., Salama, M. E., Darwish, W. S., and Harb, A. Y. (2016). Role of radiation in fish preservation. En 8th *International Toxicology Symposium in Africa* (p. 93).

Elotmani, F., Assobhei, O., Revol-Junelles, A. M., and Bernard-Milli re, J. (2004). Microflora of fresh and ice-stored sardines (*Sardina pilchardus*) from the Moroccan Atlantic coast. *Ciencias Marinas*, 30(4):627-635.

Elotmani, F., Assobhei, O., Revol-Junelles, A.M. and Milliere, J.B. (2004) Microflora of fresh and ice-stored sardines (*Sardina pilchardus*) from Moroccan Atlantic coast. *Ciencias Marinas*, 30(4):627-635.

Emborg, J., and Dalgaard, P. (2008a). Growth, inactivation and histamine formation of *Morganella psychrotolerans* and *Morganella morganii*—development and evaluation of predictive models. *International Journal of Food Microbiology*, 128(2):234-243.

Emborg, J., and Dalgaard, P. (2008b). Modelling the effect of temperature, carbon dioxide, water activity and pH on growth and histamine formation by *Morganella psychrotolerans*. *International Journal of Food Microbiology*, 128(2):226-233.

Emborg, J., Laursen, B.G. and Dalgaard, P. (2005) Significant histamine formation in tuna (*Thunnus albacares*) at 2 °C—effect of vacuum- and modified atmosphere-packaging on psychrotolerant bacteria. *Int.J.Food Microbiol.*, 101: 263–279.

Erickson, M. C. (1997). Lipid oxidation: Flavor and nutritional quality deterioration in frozen foods. En *Quality in Frozen Food*. Springer, Boston, pag:141-173

Erikson , U., Sigholt, T., Rustad, T., Einarsdottir, I.E. and Jorgensen, L. (1999) Contribution of bleeding to total handling stress during slaughter of Atlantic salmon . *Aquaculture Int.*, 7:101-115.

Erikson, U., Bayer, A.R. and Sigholt, T. (1997) Muscle high-energy phosphates and stress affect K-values during ice storage of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Food Sci.*, 62(1):43-47.

Erikson, U., Misimi, E. and Gallart-Jornet, L. (2011) Superchilling of rested Atlantic salmon: different chilling strategies and effects on fish and fillet quality. *Food Chem.*, 127:1427-1437.

Erkan, N. ; Ulusoy, S. and Tosun, S.Y. (2011) Effect of combined application of plant extract and vacuum packaged treatment on the quality of hot smoked rainbow trout. *J.Consum.Protec.Food Saf.*, 6(4):419-426

Erkan, N. and Özden, O. (2008) Quality assessment of whole and gutted sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice. *Int.J.Food Sci.Technol.*, 43:1549-1559.

Erkan, N., and Özden, Ö. (2008). Quality assessment of whole and gutted sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(9), 1549-1559.

Erkan, N., Özden, O., Alakavuk, D.U., Yildirim, S.Y. and Inugur, M. (2006) Spoilage and shelf life of sardines (*Sardina pilchardus*) packed in modified atmosphere. *Eur.Food Res.Technol.*, 222:667-673.

Espiñeira, M., Vieites, J. M., and Santaclara, F. J. (2009). Development of a genetic method for the identification of salmon, trout, and bream in seafood products by means of PCR–RFLP and FINS methodologies. *European Food Research and Technology*, 229(5):785-793.

Eszabo, E.A. and Cahill, M.E. (1999) Nisin and ALTATM 2341 inhibit the growth of *Listeria monocytogenes* on smoked salmon packaged under vacuum or 100% CO₂. *Letters in Applied Microbiology*, 28:373-377.

Etemadi, H.; Rezaei, M.; Kenari, A.A. and Hosseini, S.F. (2013) Combined Effect of Vacuum Packaging and Sodium Acetate Dip Treatment on Shelf Life Extension of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) during Refrigerated Storage. *J. Agricultural Science and Technology*, 15(5):929-939.

Evangelista, W. P., Silva, T. M., Guidi, L. R., Tette, P. A., Byrro, R. M., Santiago-Silva, P., and Gloria, M. B. A. (2016). Quality assurance of histamine analysis in fresh and canned fish. *Food Chemistry*, 211:100-106.

Fall, P.A.; Pilet, M.F.; Leduc, F.; Cardinal, M., Duflos, G.; Cuerin, C.; Joffraud, J.J. and Leroi, F. (2012) Sensory and physicochemical evolution of tropical cooked peeled shrimp inoculated by *Brochothrix thermosphacta* and *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 during storage at 8 °C. *International J. Food Microbiology*, 152(3):82-89.

Farmer, L.J., McConnell, J.M., and Kilpatrick, D.J. (2000). Sensory characteristics of farmed and wild Atlantic salmon. *Aquaculture*, 187(1-2):105-125.

Farouk, M. M., Wieliczko, K. J., and Merts, I. (2004). Ultra-fast freezing and low storage temperatures are not necessary to maintain

the functional properties of manufacturing beef. *Meat Science*, 66(1):171-179.

Fernandes, C. E., da Silva Vasconcelos, M. A., de Almeida Ribeiro, M., Sarubbo, L. A., Andrade, S. A. C., and de Melo Filho, A. B. (2014). Nutritional and lipid profiles in marine fish species from Brazil. *Food chemistry*, 160:67-71.

Fernández, J., Pérez-Alvarez, J.A. and Fernández-López, J.A. (1997) Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chem.*, 59:345-353.

Fernández-Salguero, J. and Mackie, I.M. (1983) Comparative rates of spoilage of fillets and whole fish during storage of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and herring (*Clupea harengus*) as determined by the formation of non-volatile amines. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 22:385-391.

Ferrario, M., Alzamora, S. M., and Guerrero, S. (2015). Study of the inactivation of spoilage microorganisms in apple juice by pulsed light and ultrasound. *Food Microbiology*, 46:635-642.

Ferraro, V., Carvalho, A. P., Piccirillo, C., Santos, M. M., Castro, P. M., and Pintado, M. E. (2013). Extraction of high added value biological compounds from sardine, sardine-type fish and mackerel canning residues—a review. *Materials Science and Engineering: C*, 33(6):3111-3120.

Fleming, L. E., Broad, K., Clement, A., Dewailly, E., Elmir, S., Knap, A., and Walsh, P. (2006). Oceans and human health: Emerging public health risks in the marine environment. *Marine pollution bulletin*, 53(10-12):545-560.

Fletcher, G.C. and Hodgson, J.A. (1988) Shelf-life of sterile snapper (*Chrysophrys auratus*). *J. Food Sci.*, 53:1327-1332.

Flick Jr, George J., Gi-Pyo Hong, and Geoffrey M. Knobl (1992). Lipid oxidation of seafood during storage. ACS publications, pag: 183-207.

Françoise, L. (2010). Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food Microbiology*, 27(6):698-709.

Frangos, L., Pyrgotou, N., Giatrakou, V., Ntzimani, A. and Savvaidis, I.N. (2010) Combined effects of salting, oregano oil and

vacuum-packaging on the shelf-life of refrigerated trout fillets. *Food Microbiol.*, 27(1):115-121.

Frank, H.A.; Yoshinaga, D.H. y Nip, W. (1981) Histamine formation and honey-combing during decomposition of Skipjack Tuna, *Katsuwonus pelamis*, at elevated temperatures. *Mar. Fish. Rev.*, 43(10):9-14.

Frederiksen, M. (2002) Quality chain management in fish processing. En *Safety and Quality issues in fish processing*, Ed. Bremner, A. Cambridge, pag: 289-307.

Freeman, D.W. (1999). Comparison of moist and dry cooking on sensory quality, consumer acceptance and marketability of canned bighead carp. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 8(1):33-44.

Frega, N. G., Loizzo, M. R., Pacetti, D., and Lucci, P. (2016). Canning: Impact on Food Products Quality Attributes. En *Food Processing Technologies*. CRC Press. pag:41-60

Fuentes, A., Fernández-Segovia, I., Serra, J.A. and Barat, J.M. (2010) Comparison of wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) quality. *Food Chem.*, 119:1514-1518.

Fujii, Y. (1968) Relation between the ATP-breakdowns in canned fish and the original freshness of raw-fish used. *Bull. Tokai.Region.Fish.Res. Lab.*, 55:185-193.

Fujii, Y., Shudo, K., Nakamura, K., Ishikawa, S. and Okada, M. (1973) Relation between the quality of canned fish and its content of ATP-breakdown: III. ATP-breakdown in canned albacore and skipjack in relation to the organoleptic inspection. *Bull. Jap.Soc.Sci. Fish.*, 1:69-84.

Fujii, Y.; Hirose, Y., Tezuka, H. and Noguchi, E. (1969) Relation between the quality of canned fish and its content of ATP-breakdowns-II. ATP-breakdowns in raw meat of Red and Pink salmon in relations to their inspection scores after canning. *Bull. Jp. Soc. Sci. Fish.*, 35(7):665-671.

Fuke, S., and Konosu, S. (1991). Taste-active components in some foods: a review of Japanese Research. *Physiology & Behavior*, 49(5):863-868.

Gallardo, J. M., Pérez-Martin, R. I., Franco, J. M., Aubourg, S., and Sotelo, C. G. (1990). Changes in volatile bases and trimethylamine oxide during the canning of albacore (*Thunnus alalunga*). *International Journal of Food Science & Technology*, 25(1):78-81.

Gallardo, J. M., Sotelo, C. G., and Perez-Martin, R. I. (1997). Determination of histamine by capillary zone electrophoresis using a low-pH phosphate buffer: application in the analysis of fish and marine products. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 204(5):336-340.

Gallardo, J.M. (1978) *Inf. Tecn. Inst. Inv. Pesq.*, nº 58

Ganeko, N., Shoda, M., Hirohara, I., Bhadra, A., Ishida, T., Matsuda, H., and Matoba, T. (2008). Analysis of volatile flavor compounds of sardine (*Sardinops melanostica*) by solid phase microextraction. *Journal of Food Science*, 73(1).

Ganias, K., Somarakis, S., Koutsikopoulos, C., and Machias, A. (2007). Factors affecting the spawning period of sardine in two highly oligotrophic Seas. *Marine Biology*, 151(4):1559-1569.

García-Rollan, M. (1990) Alimentación humana: errores y sus consecuencias. Ed Mundi-Prensa. Madrid.

García-Soto, B.; Aubourg, S.P.; Calo-Mata, P. and Barros-Velázquez, J. (2013) Extension of the shelf life of chilled hake (*Merluccius merluccius*) by a novel icing medium containing natural organic acids. *Food Control*, 34(2):356-363.

Gardini, F., Özogul, Y., Suzzi, G., Tabanelli, G., and Özogul, F. (2016). Technological factors affecting biogenic amine content in foods: a review. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1218.

Garrido, M. D., Hernández, M. D., Espinosa, M. C., and López, M. B. (2016). Enhanced Quality Characteristics of Refrigerated Seabream (*Sparus aurata*) Fillets Packed Under Different Systems (Modified Atmosphere vs. Vacuum). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 25(2):156-168.

Garthwaite, G.A. (2001). Refrigeración y congelación del pescado. En *Tecnología del Procesado del Pescado*. Ed. Hall, G.M. Acribia, Zaragoza. Pag:99-125.

Gates, K. W. (2015). Seafood Processing: Technology, Quality and Safety. Eds. Ioannis S. and Bozaris .. Wiley-Blackwell-John Wiley and Sons. West Sussex

Gates, K.W., Parker, A.H., Bauer, D.L., Huang, Y.W., and Rippen, T.E. (1990) Quality and safety considerations for thermally processed blue crab meat. Pag: 174-206. (http://nsgl.gso.uri.edu/flsgp/flsgpw92001/flsgpw92001_part6.pdf)

Genç, I.Y.; Esteves, E.; Aníbal, J. and Diler, A. (2013) Effects of chilled storage on quality of vacuum packed meagre fillets. *J. Food Engineering*, 115(4):486-494.

Gennari, M., Tomaselli, S., and Cotrona, V. (1999). The microflora of fresh and spoiled sardines (*Sardina pilchardus*) caught in Adriatic (Mediterranean) Sea and stored in ice. *Food Microbiology*, 16(1):15-28.

Ghaly, A. E., Dave, D., Budge, S., and Brooks, M. S. (2010). Fish spoilage mechanisms and preservation techniques. *American Journal of Applied Sciences*, 7(7):859-.

Ghanbari, M. and Jami, M. (2013b) Lactic Acid Bacteria and their bacteriocins: a promising approach to seafood biopreservation. In LactiSanc acid bacteria. R and D for food health and livestock purposes. Ed. Kongo, M., CC BY, cap 16:381-404.

Ghanbari, M.; Jami, M.; Domig, K.J. and Kneifel, W. (2013a) Seafood biopreservation by lactic acid bacteria – A review. *LWT - Food Science and Technology*, 54(2):315-324.

Gibson, A. M., Bratchell, N., and Roberts, T. A. (1987). The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. *Journal of Applied microbiology*, 62(6):479-490.

Gill, H.S., Weatherley, A.H., Lee, R. and Legere, D. (1989) Histochemical characterization of myotomal muscle of five teleost species. *J. Fish Biol.*, 34:375-386.

Gill, T. A. (1990). Objective analysis of seafood quality. *Food Reviews International*, 6(4):681-714.

Gill, T. A., and Thompson, J. W. (1984). Rapid, Automated Analysis of Amines in Seafood by Ion-Moderated Partition HPLC. *Journal of Food Science*, 49(2):603-606.

Gill, T. A., and Thompson, J. W. (1984). Rapid, Automated Analysis of Amines in Seafood by Ion-Moderated Partition HPLC. *Journal of Food Science*, 49(2):603-606.

Gill, T.A., Thompson, J.W. Gould, S. and Sherwood, D. (1987) Characterization of quality deterioration in yellowfin tuna. *J. Food Sci.*, 52:580-583.

Giménez, B.; Roncales, P. and Beltran, J.A. (2005) The effects of natural antioxidants and lighting conditions on the quality of salmon (*Salmo salar*) fillets packaged in modified atmosphere. *J.Sci.Food Agric.*, 85(6):1033-1040.

Giménez, B.; Roncalés, P. and Beltrán, J.A. (2002) Modified atmosphere packaging of filleted rainbow trout. *J.Sci. Food Agric.*, 82:1154-1159.

Gökodlu, N, Özden, Ö and Erkan, N. (1998). Physical, chemical and sensory analyses of freshly harvested sardines (*Sardina pilchardus*) stored at 4°C. *J.Aquat.Food Prod.Technol.*, 7:5-15.

Gokoglu, N. and Yerlikaya, P. (2004) Use of eye fluid refractive index in sardine (*Sardina pilchardus*) as a freshness indicator. *Eur.Food Res.Technol.*, 218:295-297.

Gokoglu, N., and Yerlikaya, P. (2015). *Seafood chilling, refrigeration and freezing: science and technology*. John Wiley & Sons.

Gomez-Guillen, M, Borderias, A.J. and Montero, P. (1996). Rheological properties of gels made from high- and low-quality sardine (*Sardina pilchardus*) mince with added non muscle proteins. *J.Agric.Food Chem.*, 44:746-750.

Gonçalves, A., and de Paiva Alves, J. (2013). High pressure technology improves the quality and yield in the seafood industry. *INFOFISH International*, 6:35-8.

González Laxe, F. (1977). Desenrolo capitalista e crise pesqueira. 4. *Inf. Téc. Inst. Esp. Oceanogr*, 174:51.

González-Laxe, F. (2000). La globalización y el comercio de los productos de la pesca. *Boletín económico de ICE, Información Comercial Española*, (2665), pag: 35-46.

Goulas, A.E. and Kontominas, M.G. (2007) Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil

on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): Biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry*, 100(1):287-296.

Graham, A. F., Mason, D. R., Maxwell, F. J., and Peck, M. W. (1997). Effect of pH and NaCl on growth from spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum* at chill temperature. *Letters in Applied Microbiology*, 24(2):95-100.

Gram, L. (1992). Evaluation of the bacteriological quality of seafood. *International Journal of Food Microbiology*, 16(1):25-39.

Gram, L. (2009). Microbiological spoilage of fish and seafood products. En *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*. Springer, New York, pag: 87-119.

Gram, L., and Dalgaard, P. (2002). Fish spoilage bacteria—problems and solutions. *Current opinion in biotechnology*, 13(3):262-266.

Gram, L., and Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1):121-137.

Grigorakis, K., Alexis, M., Gialamas, I. and Nikolopoulou, D. (2004) Sensory, microbiological, and chemical spoilage of cultured common sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice: a seasonal differentiation. *Eu. Food Res. Technol.*, 219:584-587.

Grigorakis, K., Alexis, M.N., Taylor, K.D.A. and Hole, M. (2002) Comparison of wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*): composition, appearance and seasonal variations. *Int.J.Food Sci.Technol.*, 37(5):477-484.

Grigorakis, K., Taylor, K.D. and Alexis, M. (2003) Seasonal patterns of spoilage of ice-stored cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Chem.*, 81:263-268.

Groenen, P. J., Luten, J. B., Dhont, J. H., Prins, L. A., and Vreeken, J. W. (1982). Formation of volatile N-nitrosamines from food products, especially fish, under simulated gastric conditions. *IARC scientific publications*, (41):99-112.

Guderley, H. (2004). Metabolic responses to low temperature in fish muscle. *Biological Reviews*, 79(2):409-427.

Günlü, A. and Koyun, E.(2013) Effects of Vacuum Packaging and Wrapping with Chitosan-Based Edible Film on the Extension of

the Shelf Life of Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Fillets in Cold. *Food and Bioprocess Technology*, 6(7):1713-1719.

Guisande, C. Ulla, A. and Thejil, P. (2004a) Solar activity governs abundance of Atlantic Iberian sardine, *Sardina pilchardus*. *Mar.Ecol.Prog.Series*, 269:297-301.

Guisande, C.; Cabanas, J.M.; Vergara, A.R. and Riveiro, I. (2001). Effect of climate on recruitment success of Atlantic Iberian sardine *Sardina pilchardus*. *Mar.Ecol.Prog.Series*, 223:287-297.

Guisande, C.; Vergara, A.R.; Riveiro, I. and Cabanas, J.M. (2004b) Climate change and abundance of the Atlantic-Iberian sardine (*Sardina pilchardus*). *Fish.Oceanography*, 13:91-101.

Guizani, N., Al-Busaidy, M. A., Al-Belushi, I. M., Mothershaw, A., and Rahman, M. S. (2005). The effect of storage temperature on histamine production and the freshness of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Food Research International*, 38(2):215-222.

Guizani, N., Rahman, M. S., Al-Ruzeiqi, M. H., Al-Sabahi, J. N., and Sureshchandran, S. (2014). Effects of brine concentration on lipid oxidation and fatty acids profile of hot smoked tuna (*Thunnus albacares*) stored at refrigerated temperature. *Journal of Food Science and Technology*, 51(3):577-582.

Guldager, H.S., Bøknæs, N., Østerberg, C., Nielsen, J., and Dalgaard, P. (1998). Thawed cod fillets spoil less rapidly than unfrozen fillets when stored under modified atmosphere at 2 C. *Journal of Food Protection*, 61(9):1129-1136.

Gulsun, O., Esmeray, K., Serhat, O and Fatih, O. (2009) Sensory, microbiological and chemical assessment of the freshness of red mullet (*Mullus barbatus*) and goldband goatfish (*Upeneus moluccensis*) during storage in ice. *Food Chem.*, 114:505-510.

Haard, N. (2002) The role of enzymes in determining seafood color, flavor and texture. En *Safety and Quality issues in fish processing*, Ed. Bremner, A. Cambridge, pag: 220-252.

Haard, N.F. (1999) Valor nutritivo y composición de las proteínas y otros compuestos nitrogenados del pescado. En *El pescado y los productos derivados de la pesca: composición, propiedades -- nutritivas y estabilidad*. Ed. Ruiter, A., Acribia, Zaragoza., pag:81-122.

Hagi, T., Tanaka, D., Iwamura, Y., and Hoshino, T. (2004). Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. *Aquaculture*, 234(1-4):335-346.

Hall, G.M. (2001) Tecnología del procesamiento del pescado. Ed. Acribia, Zaragoza. 305 pag.

Hamada-Sato, N., Usui, K., Kobayashi, T., Imada, C. and Watanabe, E. (2005) Quality Assurance of raw fish based on HACCP concept. *Food Control*, 16:301-307.

Hamilton, M., and Bennett, R. (1983). An investigation into consumer preferences for nine fresh white fish species and the sensory attributes which determine acceptability. *International Journal of Food Science & Technology*, 18(1):75-84.

Han, D., Han, I., and Dawson, P. (2016). Combining modified atmosphere packaging and nisin to preserve Atlantic salmon. *Journal of Food Research*, 6(1):22

Hansen, A., Morkore, T., Rudi, K., Langsrud, O and Eie, T. (2009) The combined effect of superchilling and modified atmosphere packaging using CO₂ emitter on quality during chilled storage of pre-rigor salmon fillets (*Salmo salar*). *J.Sci.Food Agric.*, 89:1625-1633.

Hansen, A.Å., Rødbotten, M., Lea, P., Rotabakk, B T., Birkeland, S., and Pettersen, M.K. (2015). Effect of transport packaging and repackaging into modified atmosphere on shelf life and quality of thawed Atlantic cod loins. *Packaging Technology and Science*, 28(11):925-938.

Harada, K. (2006) Analysis of quick refrigeration methods to maintain the freshness of fish caught by offshore trawl fisheries in the western part of the Sea of Japan. *Nip. Sui. Gak.*, 72(3):440-446.

Hardy, R. and Smith, G.M. (1976) The storage of Mackerel (*Scomber scombrus*). Development of histamine and rancidity. *J.Sci. Food Agric.*, 595-599.

Hassoun, A., and Çoban, Ö. E. (2017). Essential oils for antimicrobial and antioxidant applications in fish and other seafood products. *Trends in Food Science & Technology*, 68:26-36.

Hassoun, A., and Karoui, R. (2015). Front-face fluorescence spectroscopy coupled with chemometric tools for monitoring fish

freshness stored under different refrigerated conditions. *Food Control*, 54:240-249.

Hassoun, A., and Karoui, R. (2017). Quality evaluation of fish and other seafood by traditional and nondestructive instrumental methods: Advantages and limitations. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(9):1976-1998.

Hattula, T and Kiesvaara, M. (1996) Breakdown products of adenosine triphosphate in heated fishery products as an indicator of raw material freshness and of storage quality. *Lebens.-Wis.-u.-Technol.*, 29:135-139.

Hattula, T. (1997) Adenosine triphosphate breakdown products as a freshness indicator of some fish species and fish products. *Tech. Res. Center Finland*. VTT Publications, n°297, pag 48.

Hattula, T., and Kiesvaara, M. (1996). Breakdown products of adenosine triphosphate in heated fishery products as an indicator of raw material freshness and of storage quality. *LWT-Food Science and Technology*, 29(1-2):135-139.

Hattula, T., Elfving, K., Mroueh, U. M., and Luoma, T. (2001). Use of liquid smoke flavouring as an alternative to traditional flue gas smoking of rainbow trout fillets (*Oncorhynchus mykiss*). *LWT-Food Science and Technology*, 34(8):521-525.

Hattula, T., Kiesvaara, M. and Moran, M. (1993) Freshness evaluation in European white fish (*Coregonus wartmanni*) during chill storage. *J. Food Sci.*, 58(6):1212-1215,1236.

Heia, K., Esaiassen, M., Nilsen, H., Sigernes, F., Luten, J., Oehlenschläger, J., (2003). Visible spectroscopy- Evaluation of storage time of ice stored cod and frozen stored hake. In *Quality of fish from catch to consumer: Labelling, monitoring and traceability*. Wageningen Academic Publishers, 2003: (ISBN: 9076998140) pag:201–210.

Henderson, R. J., and Almatar, S. M. (1989). Seasonal changes in the lipid composition of herring (*Clupea harengus*) in relation to gonad maturation. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 69(2):323-334..

Herbert, R.A., Ellis, J. R., and Shewan, J.M. (1975). Isolation and identification of the volatile sulphides produced during chill-storage of

north sea cod (*Gadus morhua*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26(8):1187-1194.

Herland, H., Esaiassen, M., Cooper, M. and Olsen, R. L. (2009). Changes in trimethylamine oxide and trimethylamine in muscle of wild and farmed cod (*Gadus morhua*) during iced storage. *Aquaculture Research*, 41(1):95-102.

Hernández-Herrero, M. M., Roig-Sagués, A. X., Rodríguez-Jerez, J. J., and Mora-Ventura, M. T. (1999). Halotolerant and halophilic histamine-forming bacteria isolated during the ripening of salted anchovies (*Engraulis encrasicolus*). *Journal of Food Protection*, 62(5):509-514.

Herrera, J. y Muñoz, F. (1957) Consideraciones biológicas sobre la composición química de la sardina (*Sardina pilchardus* Walb.) de Castellón. *Inv. Pesq.*, 7:33-48.

Hersom, A.C. and Hulland, E.D. (1980) *Canned Foods- Thermal processing and Microbiology*, 7nd ed., Churchill Livingstone, London.

Hielm, S., Hyytiä, E., Andersin, A. B., and Korkeala, H. (1998). A high prevalence of *Clostridium botulinum* type E in Finnish freshwater and Baltic Sea sediment samples. *Journal of Applied Microbiology*, 84(1):133-137.

Hollingworth, T.A., Throm, H.R. and Wekell, M.M. (1987) Determination of ethanol in canned salmon. En *Seafood Quality Determination*. Eds. Kramer, D.E. and Liston, J.; Amsterdam, pag: 153-160.

Hong, H., Regenstein, J. M., and Luo, Y. (2017). The importance of ATP-related compounds for the freshness and flavor of post-mortem fish and shellfish muscle: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(9):1787-1798.

Horner, W.F.A. (2001) Conservas de pescado y productos de la pesca. En *Tecnología del Procesado del Pescado*. Ed. Hall, G.M. Acribia, Zaragoza. Pag:127-168.

Howgate, P. (2005). Kinetics of degradation of adenosine triphosphate in chill-stored rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Food Science & Technology*, 40(6):579-588.

Howgate, P. (2006) A review of the kinetics of degradation of inosine monophosphate in some species of fish during chilled storage. *Int. J. Food Sci.*, 41:341-353

Howgate, P. (2009) Traditional methods. En *Fishery Products: quality, safety and authenticity*. Eds. Rehbein, H. and Oehlenschläger, J. Wiley-Blackwell, Oxford. Pag:19-41.

Howgate, P. (2010a). A critical review of total volatile bases and trimethylamine as indices of freshness of fish. Part 1. Determination. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural & Food Chemistry*, 9(1).

Howgate, P. (2010b). A critical review of total volatile bases and trimethylamine as indices of freshness of fish. Part 2. Formation of the bases, and application in quality assurance. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural & Food Chemistry*, 9(1).

Howgate, P. (2011) Psychophysics and the sensory assessments of fish. *J.Aqua.Food Prod.Technol.*, 20(1):2-15.

Hsu, C. K., Kolbe, E. R., Morrissey, M. T., Wang, D. Q., and MacDonald, G. A. (1993). Comparison of physical, thermal and chemical methods to measure protein denaturation in frozen Pacific whiting (*Merluccius productus*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2(2):31-49.

Hsu, C. P., Huang, H. W., and Wang, C. Y. (2014). Effects of high-pressure processing on the quality of chopped raw octopus. *LWT-Food Science and Technology*, 56(2):303-308.

<https://nofima.no/en/nyhet/2018/01/using-light-to-find-blood-in-fish/>

<https://www.tomra.com/en/sorting/food/process-analytics>

Hui, Y. H., Cross, N., Kristinsson, H. G., Lim, M. H., Nip, W. K., Siow, L. F., and Stanfield, P. S. (2006). Biochemistry of seafood processing. *Food Biochemistry and Food Processing*, 1:12-15.

Hui, Y. H., Cross, N., Kristinsson, H. G., Lim, M. H., Nip, W. K., Siow, L. F., and Stanfield, P. S. (2012). Biochemistry of seafood processing. En *Food Biochemistry and Food Processing*, 2nd Edition, pag:344-364.

Huidobro, A., Mendes, R. and Nunes, M.L. (2001) Slaughtering of gilthead seabream (*Sparus aurata*) in liquid ice: influence on fish quality. *Eur.Food Res.Technol.*, 213:267-272.

Huidobro, A., Pastor, A. and Tejada, M. (2001) Adenosine triphosphate and derivatives as freshness indicators of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Sci. Technol. Int.*, 7(1):23-30.

Hunter, B. J., and Roberts, D. C. (2000). Potential impact of the fat composition of farmed fish on human health. *Nutrition Research*, 20(7):1047-1058.

Hurtado-Rodríguez, R., Fountoulaki, E., Grigorakis, K., Alexis, M. and Flos, R. (2010) Season and size effects: changes in the quality of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Medit.Mar.Sci.*, 11(1):117-131.

Huss, H. H. (1980). Distribution of *Clostridium botulinum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 39(4):764-769.

Huss, H. H. (1994). *Assurance of seafood quality*. Food & Agriculture Org.. N° 334

Huss, H. H., Jakobsen, M., and Liston, J. (1992). Quality assurance in the fish industry. En *Quality Assurance in the Fish Industry*, Elsevier, Amsterdam; pag 427-

Hwang, D.F., Chang, S.H., Shiau, C.Y. and Cheng, C.C. 1995. Biogenic amines in the flesh of sailfish (*Istiophorus platypterus*) responsible for scombroid poisoning. *J. Food Sci.*, 60:926-928.

Hyttiä, E., Hielm, S., and Korkeala, H. (1998). Prevalence of *Clostridium botulinum* type E in Finnish fish and fishery products. *Epidemiology & Infection*, 120(3):245-250.

Iida, H.; Nakamura, K., Tokunaga, T. y Sato, K. (1982) Study on the several chemical tests for estimating the quality of canned product. II. On the canned sardine and masu-salmon. *Bull. Tokai Reg. Fish. Lab.*, 107:11-23.

Ikawa, J.Y., and Genigeorgis, C. (1987). Probability of growth and toxin production by nonproteolytic *Clostridium botulinum* in rockfish fillets stored under modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, 4(2):167-181.

Imamura, S., Suzuki, M., Okazaki, E., Murata, Y., Kimura, M., Kimiya, T., and Hiraoka, Y. (2012). Prevention of thaw-rigor during

frozen storage of bigeye tuna *Thunnus obesus* and meat quality evaluation. *Fisheries Science*, 78(1):177-185.

Inoue, K., Morioka, K., Shioya, I., Mitsuboshi, T., Itoh, Y., Obatake, A. and Satake, M. (1998a) Effects of deep seawater acclimation on components and texture of the muscle of Red Sea Bream. *Fish.Sci.*, 64(5):804-807.

Inoue, K., Morioka, K., Shioya, I., Mitsuboshi, T., Itoh, Y., Obatake, A. and Satake, M. (1998b) Short-term rearing of Red Sea Bream in deep seawater and its effects on *Rigor Mortis*.. *Fish.Sci.*, 64(5):798-803.

Itoh, D., Koyachi, E., Yokokawa, M., Murata, Y., Murata, M. and Suzuki, H. (2013) Microdevice for on-site fish freshness checking based on K-value measurement. *Anal. Chem.*, 85:10962-10968.

Ivanović, J. S., Janjić, J. M., Grbić, S. M., Đorđević, J. P., Glamočlija, N. M., Baltić, T. M., and Baltić, M. Ž. (2016). Effect of modified atmosphere and vacuum packaging conditions on selected chemical and physico-chemical parameters of marinated and salted Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). *Food and Feed Research*. 43(2):111-118.

Iversen, K. H. (2014). *Oxidative and Hydrolytic Changes in Lipids of pelagic Fish during different Processing Steps*. Tesis Doctoral, Institutt for bioteknologi.

Iwamoto, M., Yamanaka, H., Watabe, S. and Hashimoto, K. (1987) Effect of storage temperature on rigor mortis and ATP degradation in plaice *Paralichthys olivaceus* muscle. *J. Food Sci.*, 52:1514-1517.

Jacobsen, C., Nielsen, H. H., Jørgensen, B., and Nielsen, J. (2010). Chemical processes responsible for quality deterioration in fish. En *Chemical deterioration and physical instability of food and beverages*, pag: 439-465.

Jasson, A.C. and Lees, A. (1971) Estimation of fish freshness by dielectric measurement. *Departament of Trade and Industry*, London.

Jayasena, D.D. and Jo, C. (2013) Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review *Trends in Food Science & Technology*, In Press, Accepted Manuscript, Available online 27 September 2013.

Jeevanandam, K., Kakatkar, A., Doke, S. N., Bongirwar, D. R., and Venugopal, V. (2001). Influence of salting and gamma irradiation on the shelf-life extension of threadfin bream in ice. *Food Research International*, 34(8):739-746.

Jelinek, G. (1985). Sensory evaluation of foods: Theory and practice. Ellis, Horwood.

Jeyasekaran, G. and Saralaya, K.V. (1991) Effect of chilled sea water storage of white sardine (*Kowala coval*) on its canned product quality. *J. Food Sci. Technol.-Mysore*, 28(1):23-26.

Jeyasekaran, G. and Saralaya, K.V. (1991) Process development for canning of White sardine (*Kowala coval*). *Fish. Technol.*, 28:128-131.

Jeya-Shakila, R., Jeyasekaran, G., Princy Vyla, S.A. and Saravana Kumar, R. (2005) Effect of delayed processing on changes in histamine and other quality characteristics of 3 commercially canned fishes. *J. Food Sci.*, 70(1): 24-29.

Jiang, S. T., Lee, J. J., & Chen, H. C. (1996). Proteolysis of actomyosin by cathepsins B, L, L-like, and X from mackerel (*Scomber australasicus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(3):769-773.

Jianrong, Z. J. L. (2010). Properties of Trimethylamine-N-oxide Demethylase and Relation between the Enzyme and Formation of Formaldehyde in the Squid from Peru. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2:022.

Jinadasa, B. K. (2014). Determination of Quality of Marine Fishes Based on Total Volatile Base Nitrogen test (BVT-N). *Nature and Science*, 12(5):106-111

Jinadasa, B. K. K. K., Galhena, C. K., and Liyanage, N. P. P. (2015) Histamine formation and the freshness of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) stored at different temperatures. *Cogent Food & Agriculture*, 1(1): 1028735

Johansen, S., Magnussen, O.M. and Nordtvedt, T.S. (1996) Effects of rapid chilling and low temperatures on fish quality. En *Refrigeration and Aquaculture.*, Ed. Int.Inst.Refrigerat., pag:299-306.

Johnston, I. A., and Moon, T. W. (1980). Endurance exercise training in the fast and slow muscles of a teleost fish (*Pollachius virens*). *Journal of Comparative Physiology*, 135(2):147-156.

Jones, N.R. and Murray, J. (1964) Rapid measures of nucleotide dephosphorylation in iced fish muscle, their value as indices of freshness and of inosine 5'-monophosphate concentration. *J. Sci. Food Agric.*, 15:763-774.

Jónsdóttir, R., Sveinsdóttir, K., Magnússon, H., Arason, S., Lauritzen, K., and Thorarinsdóttir, K. A. (2011). Flavor and quality characteristics of salted and desalted cod (*Gadus morhua*) produced by different salting methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8):3893-3904.

Juneja, V.K., Marmer, B.S., Phillips, J.G., and Miller, A.J. (1995). Influence of the intrinsic properties of food on thermal inactivation of spores of nonproteolytic *Clostridium botulinum*: development of a predictive model. *Journal of Food Safety*, 15(4):349-364.

Kaewmanee, T., Karrila, T. T., and Benjakul, S. (2015). Effects of fish species on the characteristics of fish cracker. *International Food Research Journal*, 22(5): 457-462.

Kakatkar, A. S., Gautam, R. K., and Shashidhar, R. (2017). Combination of glazing, nisin treatment and radiation processing for shelf-life extension of seer fish (*Scomberomorus guttatus*) steaks. *Radiation Physics and Chemistry*, 130:303-305.

Kamiya, A., and Ose, Y. (1984). Study of odorous compounds produced by putrefaction of foods: V. Fatty acids, sulphur compounds and amines. *Journal of Chromatography A*, 292(2):383-391.

Kanki, M., Yoda, T., Ishibashi, M. and Tsukamoto, T. (2004) *Photobacterium phosphoreum* caused a histamine fish poisoning incident. *Int.J.Food Microbiol.*, 92(1):79-87.

Kanner, J., Harel, S. and Jaffe, R. (1991) Lipid-peroxidation of muscle food as affected by NaCl. *J.Agric. Food Chem.*, 39:1017-1021.

Kanoh, S., Suzuki, T., Maeyama, K., Takewa, T., Watabe, S. and Hashimoto, K. (1986) Comparative studies on ordinary and dark muscles of tuna fish. *Nip. Sui.Gak.*, 52(19):1807-1816.

Karakaya, E., and Duman, M. (2016). Effect of the packaging on the quality of *Salmo trutta* macrostigma during chilled storage. *International Food Research Journal*, 23(5):1911-1917

Karlsdottir, M.G, Petty, H.T. and Kristinsson, H.G. (2014) Oxidation in aquatic foods and analysis methods. En Antioxidants and Functional Components in Aquatic Foods. Eds Kristinsson, H.G.. Wiley-Blackwell. Pag: 1-22.

Karthiayani, T. C., and Iyer, K. M. (1971). Seasonal variations of bacterial flora of fresh oil sardines (*Sardinella longiceps*).

Karthiayani, T. C., and Mahadeva Iyer, K. (1967). Quantitative and qualitative studies on the bacterial flora of fresh sardines. *Fishery Technology*, 4(2):89-97.

Karube, I., Matsuoka, H., Suzuki, S., Watanabe, E., and Toyama, K. (1984). Determination of fish freshness with an enzyme sensor system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32(2):314-319.

Kasimoglu, A. Denli, E. and Ic, E. (2003) The extension of the shelf-life of sardine which were packaged in vacuum stored under refrigeration, and treated by γ -irradiation. *Int.J.Food Sci.Technol.*, 38:529-535.

Kaufmann, A., and Maden, K. (2018). Easy and Fast Method for the Determination of Biogenic Amines in Fish and Fish Products with Liquid Chromatography Coupled to Orbitrap Tandem Mass Spectrometry. *Journal of AOAC International*, 101(2):336-341.

Kautter, D. A., Lilly Jr, T., LeBlanc, A. J., and Lynt, R. K. (1974). Incidence of *Clostridium botulinum* in crabmeat from the blue crab. *Applied microbiology*, 28(4):722.

Kawai, T., and Sakaguchi, M. (1996). Fish flavor. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36(3):257-298.

Ke, P.J.; Burns, B.G. and Helbig, N.B. (1990) *Biochemical methods of fish quality evaluation*. MUN Publication Services, MEMORIAL Univ. Newfoundland.

Kedar, J. G., Pagarkar, A. U., Shingare, P. E., Bhosale, B. P., Shinde, K. M., and Kulkarni, G. N. (2016). Effect of sodium benzoate on the shelf life of vacuum packed Catla fish steaks stored at chilled temperature. *Bioscience Biotechnology Research Communications*, 9(3), 421-427.

Kelleher, S. D., and Zall, R. R. (1983). Ethanol accumulations in muscle tissue as a chemical indicator of fish spoilage. *Journal of Food Biochemistry*, 7(2):87-92.

Kenar, M., Özogul, F. and Kuley, E. (2010) Effects of rosemary and age tea extracts on the sensory, chemical and microbiological changes of vacuum-packed and refrigerated sardine (*Sardina pilchardus*) fillets. *Int.J.Food Sci.Technol.*, 45:2366-2372.

Keow, C. M., Bakar, F. A., Salleh, A. B., Heng, L. Y., Wagiran, R., and Bean, L. S. (2007). An amperometric biosensor for the rapid assessment of histamine level in tiger prawn (*Penaeus monodon*) spoilage. *Food Chemistry*, 105(4):1636-1641.

Kestin, S., Wotton, S. and Adams, S. (1995) The effect of CO₂, concussion or electrical stunning of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on fish welfare. In *Quality in Aquaculture*, Special Publication n° 23, European Aquaculture Society, Ghent, Belgium, pag 380-381.

Kietzmann, U.; Priebe, K.; Rakou, D. and Reichstein, K. (1969) *Seefisch als Lebensmittel*, Ed. Paul Parey Verlag. Hamburgo-Berlín.

Kilinc, B., Cakli, S. and Tolasa, S. (2008) Quality changes on sardine (*Sardina pilchardus*) patties during refrigerated storage. *J. Food Qual.*, 31:366-381.

Kim, M. K., Mah, J. H., and Hwang, H. J. (2009). Biogenic amine formation and bacterial contribution in fish, squid and shellfish. *Food Chemistry*, 116(1):87-95.

Kim, S. H., Barros-Velázquez, J., Ben-Gigirey, B., Eun, J. B., Jun, S. H., Wei, C. I., and An, H. (2003). Identification of the main bacteria contributing to histamine formation in seafood to ensure product safety. *Food Science and Biotechnology*, 12(4), 451-460.

Kim, S. H., Ben-Gigirey, B., Barros-Velazquez, J., Price, R. J., and An, H. (2000). Histamine and biogenic amine production by *Morganella morganii* isolated from temperature-abused albacore. *Journal of Food Protection*, 63(2):244-251.

Kim, S. H., Price, R. J., Morrissey, M. T., Field, K. G., Wei, C. I., and An, H. (2002). Histamine Production by *Morganella morganii* in Mackerel, Albacore, Mahi-mahi, and Salmon at Various Storage Temperatures. *Journal of Food Science*, 67(4):1522-1528.

Kim, S. H., Wei, C. I., Clemens, R. A., and An, H. (2005). Histamine accumulation in seafoods and its control to prevent outbreaks of scombroid poisoning. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 13(4):81-100.

Kinsey, S. T., Locke, B. R., and Dillaman, R. M. (2011). Molecules in motion: influences of diffusion on metabolic structure and function in skeletal muscle. *Journal of Experimental Biology*, 214(2):263-274.

Kolokowska, A. and Deutry, J. (1983) Some comments on the usefulness of 2-thiobarbituric acid (TBA) test for the evaluation of rancidity in frozen fish. *Nahrung*, 27:513-518.

Köse, S. (2010). Evaluation of seafood safety health hazards for traditional fish products: preventive measures and monitoring issues. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 10(1).

Koutsoumanis, K. (2001). Predictive modeling of the shelf-life of fish under non-isothermal conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4):1821-1829.

Koutsoumanis, K., Lampropoulou, K., and Nychas, G. J. E. (1999). Biogenic amines and sensory changes associated with the microbial flora of Mediterranean gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) stored aerobically at 0, 8, and 15 °C. *Journal of Food Protection*, 62(4):398-402.

Kris-Etherton, P. M., Harris, W. S., and Appel, L. J. (2002). Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation*, 106(21):2747-2757.

Kristoffersen, S., Tobiassen, T., Steinsund, V., and Olsen, R. L. (2006). Slaughter stress, postmortem muscle pH and rigor development in farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *International Journal of Food Science and Technology*, 41(7):861-864.

Krzynowek, J., Uljua, D. S., Panunzio, L. J., and Maney, R. S. (1992). Factors Affecting Fat, Cholesterol, and Omega-3 Fatty Acids in Maine Sardines. *Journal of Food Science*, 57(1):63-65.

Kuda, T., Fujita, M., Goto, H. and Yano, T. (2007) Effects of freshness on ATP- related compounds in retorted chub mackerel *Scomber japonicus*. *LWT* 40:1186-1190.

Kuda, T., Fujita, M., Goto, H. and Yano, T. (2008) Effects of retort conditions on ATP-related compounds in pouched fish muscle. *LWT* 41:469-473.

Kuda, T., Fujita, M., Goto, H., and Yano, T. (2008). Effects of retort conditions on ATP-related compounds in pouched fish muscle. *LWT-Food Science and Technology*, 41(3):469-473

Kuley, E.; Ozogul, F.; Durmus, M.; Gokdogan, S.; Kacar, C.; Ozogul, Y. and Ucar, Y. (2012) The impact of applying natural clinoptilolite (Zeolite) on the chemical, sensory and microbiological changes of vacuum packed sardine fillets. *Int.J.Food Sci.Technol.*, 47(9):1977-1985.

Kung, H. F., Tsai, Y. H., and Wei, C. I. (2007). Histamine and other biogenic amines and histamine-forming bacteria in miso products. *Food Chemistry*, 101(1):351-356.

Kuninaka, A., Kibi, M., and KinÍchiro, K. (1964) Development of flavor nucleotides. *Food Technol.*, 18(3):287-293.

Ladikos, D., and Lougovois, V. (1990). Lipid oxidation in muscle foods: a review. *Food Chemistry*, 35(4):295-314.

Lakshmanan, R., Shakila, R.J., and Jeyasekaran, G. (2002) Survival of amine-forming bacteria during ice storage of fish and shrimp. *Food Microbiol.*, 19:617-625.

Lall, S.P. (1999) Macro y microelemntos (traza) del pescado y del marisco. En *El pescado y los productos derivados de la pesca: composición, propiedades --nutritivas y estabilidad*. Ed. Ruiter, A., Acibia, Zaragoza., pag:197-224.

Lall, S.P. and Parazo, M.P. (1999) Vitaminas del pescado y del marisco. En *El pescado y los productos derivados de la pesca: composición, propiedades --nutritivas y estabilidad*. Ed. Ruiter, A., Acibia, Zaragoza., pag:165-196.

Lang, O.W. and Dean, S.J. (1934) Heat resistance of *Clostridium botulinum* in canned seafoods. *Journal of Infectious Diseases*, 55(1):39-59.

Larsen, A., Tao, Z., Bullard, S. A., and Arias, C. R. (2013). Diversity of the skin microbiota of fishes: evidence for host species specificity. *FEMS microbiology ecology*, 85(3), 483-494.

Lauzon, H.L., Magnusson, H., Sveinsdottir, K., Gudjonsdottir, M. Martinsdottir, E. (2009) Effect of brining, modified atmosphere packaging, and superchilling on the shelf life of cod (*Gadus morhua*) loins. *J.Food Sci.*, 74(6):M258-M267.

Lavin, A., Díaz del Río, G., Casas, G. and Cabanas, J.M. (2000) Afloramiento en el noroeste de la península ibérica. Indices de afloramiento para el punto 43°N, 11°W. Periodo 1990-1999. Datos y Resúmenes, nº15. IEO.

Lawal, A.T. and Adeloju, S.B. (2012) Mediated xanthine oxidase potentiometric biosensors for hypoxanthine based on ferrocene carboxylic acid modified electrode. *Food Chem.*, 135:2982-2987.

Lehane, L. and Olley, J. (2000) Histamine fish poisoning revisited. *Int.J.Food Microbiol.*, 58:1-37.

Lehmann, I. and Aubourg, S.P. (2008) Effect of previous gutting on rancidity development in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) during frozen storage at -20°C. *Int.J.Food Sci. Technol.*, 43:270-275.

Leitao, M.F., Baldini, V.L., Ubaldi-Eiroa, M.N. and Destro, M.T. (1983) Bacterias produtoras de histamine em pescado de origen marinha. *Col. ITAL, Campinas*, 13:83-98.

Lenas, D., Chatziantoniou, S., Nathanailides, C. and Triantafillou, D. (2011) Comparison of wild and farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) lipid quality. *Procedia Food Sci.*, 1:1139-1145.

Levin, R. E. (2016). Assessment of seafood spoilage and the microorganisms involved. *Safety Analysis of Foods of Animal Origin*, 463.

Li, L., Valenzuela-Martínez, C.; Redondo, M.; Juneja, V.K.; Burson, D.E. and Thippareddi, H. (2012) Inhibition of *Clostridium perfringens* Spore Germination and Outgrowth by Lemon Juice and Vinegar Product in Reduced NaCl Roast Beef. *J. Food Science*, 77(11):M598-M603.

Li, P., Yin, Y. L., Li, D., Kim, S. W., and Wu, G. (2007). Amino acids and immune function. *British Journal of Nutrition*, 98(2):237-252.

Li, Q., Li, D., Qin, N., Hong, H., and Luo, Y. (2016). Comparative studies of quality changes in white and dark muscles from common carp (*Cyprinus carpio*) during refrigerated (4°C)

storage. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(5), 1130-1139.

Lin, M., Mousavi, M., Al-Holy, M., Cavinato, A. G., and Rasco, B. A. (2006). Rapid near infrared spectroscopic method for the detection of spoilage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet. *Journal of Food Science*, 71(1).

Liu, D., Zeng, X. A., and Sun, D. W. (2013). NIR spectroscopy and imaging techniques for evaluation of fish quality—a review. *Applied Spectroscopy Reviews*, 48(8):609-628.

Logotheti, M., Theochari, K., Kostakis, M., Pasias, I. N., and Thomaidis, N. S. (2018). Development and validation of a HILIC-UV method for the determination of nucleotides in fish samples. *Food chemistry*, 248:70-77.

López Gálvez, D.E., de la Hoz, L., Blanco, M. and Ordóñez, J.A. (1998) Refrigerated storage (2°C) of sole (*Solea solea*) fillets under CO₂-enriched atmospheres. *J. Agric-Food Chem.*, 46:1143-1149.

López-Caballero, M.E., Huidobro, A., Pastor, A. and Tejada, M. (2002) Microflora of gilthead seabream (*Sparus aurata*) stored in ice. Effect of washing. *Eur.Food Res.Technol.*, 215:396-400.

López-Capont, F. (1988). *El desarrollo industrial pesquero en el siglo XVIII. Los salazoneros catalanes llegan a Galicia*. Ed. Fundación Barrié de la Maza. A Coruña.

López-Capont, F. (2001). *La conserva y la salazón de la sardina*. Ed. Caixanova. Poio.

Lopez-Sabater, E. I., Rodriguez-Jerez, J. J., Roig-Sagues, A. X., Mora, T. and -Ventura, M. A. (1994). Bacteriological quality of tuna fish (*Thunnus thynnus*) destined for canning: effect of tuna handling on presence of histidine decarboxylase bacteria and histamine level. *Journal of Food Protection*, 57(4):318-323.

López-Sabater, E. I., Rodríguez-Jerez, J., Hernández-Herrero, M., and Mora-Ventura, M. T. (1996). Incidence of histamine-forming bacteria and histamine content in scombroid fish species from retail markets in the Barcelona area. *International Journal of Food Microbiology*, 28(3):411-418.

Losada, V., Barros-Velázquez, J.M. and Aubourg, S.P. (2004) Effect of advanced chilling methods on lipid damage during sardine (*Sardine pilchardus*). *Eur.J.Lipid Sci.Technol.*, 106:844-850.

Losada, V., Barros-Velázquez, J. and Aubourg, S.P. (2007) Rancidity development in frozen pelagic fish: influence of slurry ice as preliminary chilling treatment. *LWT* 40:991-999.

Losada, V., Rodríguez, A., Ortiz, J. and Aubourg, S.P. (2006) Quality enhancement of canned sardine (*Sardina pilchardus*) by a preliminary slurry ice chilling treatment. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 108:598-605.

Lotina, R. (1985) Biología, Geografía y hábitat de las sardinas ibéricas. En *La sardina. Un tesoro de nuestra mar*. Ed. FROM, Ministerio de Agricultura, Pesca y alimentación. Pag: 73-83.

Love, R.M. (2001) Bioquímica dinámica y calidad del pescado fresco y congelado. En *Tecnología del Procesado del Pescado*. Eds. Hall, G.M. Ed. Acribia, Zaragoza, pag:1-33

Lowe, T. E., Ryder, J. M., Carragher, J. F., and Wells, R. M. G. (1993). Flesh quality in snapper, *Pagrus auratus*, affected by capture stress. *Journal of Food Science*, 58(4):770-773.

Lozano, F. (1990) Variación estacional de los contenidos de humedad y grasa del músculo de *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1972) de las aguas de Tenerife (Islas Canarias). *ALIMENTARIA*, 212:59-65.

Ludorff, W. and Meyer, V. (1978) El pescado y los productos de la pesca. Ed. Acribia, Zaragoza. 342 pag.

Lugo-Sánchez, M.E., Pacheco-Aguilar, R. and Yepiz-Plascencia, G.M. (1996). Partial characterization of proteinase activity in sarcoplasmic fluid of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) muscle. *J.Aquat.Food Prod.Technol.*, 5:51-66.

Lund, B. M., and Wyatt, G. M. (1984). The effect of redox potential, and its interaction with sodium chloride concentration, on the probability of growth of *Clostridium botulinum* type E from spore inocula. *Food Microbiology*, 1(1):49-65.

Lund, B.; Graham, M.A.F. and Franklin, J.G. (1987) The effect of acid pH on the probability of growth of proteolytic strains of

Clostridium botulinum. *International Journal of Food Microbiology*, 4(3):215-226.

Lund, B.M.; Wyatt, G.M. and Graham, A.F. (1985) The combined effect of low temperature and low pH on survival of, and growth and toxin formation from, spores of *Clostridium botulinum*. *Food Microbiology*, 2(2):135-145.

Luong, J.H.T., Male, K.B., Masson, C and Nguyen, A. I. (1992) Hypoxanthine ratio determination in fish extract using capillary electrophoresis and immobilized enzymes. *J. Food Sci.*, 57:77-81.

Lupín, H. M., Yeannes, M. I., y del Valle, C. E. (1983). Nota: generación de bases nitrogenadas volátiles durante el proceso de elaboración de conservas de pescado. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 23(4):585-590.

Lv, L., Lin, H., Li, Z., Song, Y., Lin, H., and Wang, A. (2014). Identification of oxidative modification of shrimp (*Metapenaeus ensis*) tropomyosin induced by malonaldehyde. *European Food Research and Technology*, 239(5):847-855.

Lynt, R. K., Solomon, H.M., Lilly, T., and Kautter, D. A. (1977). Thermal death time of *Clostridium botulinum* type E in meat of the blue crab. *Journal of Food Science*, 42(4):1022-1025.

Mafart, P.; Couvert, O.; Gaillard, S. and Leguerinel, I. (2002) On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology*, 72(1-2):107-113.

Majumdar, R. K., Dhar, B., Saha, A., Roy, D., Parhi, J., and Singh, A. S. (2017). Evaluation of Textural Quality as a Parameter to Optimize Thermal Process During Retort Pouch Processing of Boneless Rohu Balls in Curry Medium. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(3).

Makarios-Laham, I. K., and Lee, T. C. (1993). Protein hydrolysis and quality deterioration of refrigerated and frozen seafood due to obligately psychrophilic bacteria. *Journal of Food Science*, 58(2):310-313.

Malle, P., and Poumeyrol, M. (1989). A new chemical criterion for the quality control of fish: trimethylamine/total volatile basic nitrogen (%). *Journal of Food protection*, 52(6):419-423.

Manuel, H. J., Thompson, M., and Carroll, K. (2011). Emerging Trends in Seafood Processing Technologies. *Journal of Ocean Technology*, 6(4):15-20.

Mariutti, L. R., and Bragagnolo, N. (2017). Influence of salt on lipid oxidation in meat and seafood products: A review. *Food Research International*, 94:90-100.

Marqués, A. (2017) Conservas de Pescado y vegetales: calidad asegurada. *Distribución y consumo*. 4:19-22

Marquez-Rios, E., Pacheco-Aguilar, R., Ramirez-Suarez, J. C., Ocano-Higuera, V. M., García-Sifuentes, C. O., Scheuren-Acevedo, S. M., and Mazorra-Manzano, M. A. (2016). Postmortem biochemical and microbiological changes in loricariid catfish (*Pterygoplichthys disjunctivus*) muscle during ice storage. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 25(1):105-113.

Martín, V.J. (2017) Consumo de pescados y mariscos en España. *Distribución y consumo*. 4:5-18

Martín-Cerdeño, V.J. (2012) Consumo de pescado y mariscos. *Distribución y Consumo*, septiembre-octubre:5-20.

Martínez, I. (2006) Revision of analytical methodologies to verify the production method of fish. En *Seafood research from fish to dish*. Eds. Luten, J.B., Jacobsen, C., Bekaert, K., Saebo, A. and Oehlenschläger, J. Wageningen Academic Publishers, Wageningen.

Martinsdottir, E., Sveinsdottir, K., Luten, J.B., Schelvis-Smit, R. and Hyldig, G. (2001). Reference manual for the fish sector: sensory evaluation of fish freshness. *The Netherlands: QIM Eurofish*.

Martinsdottir, E., Valdimarsdottir, P., Porkelsdottir, A., Olafsdottir, G. and Tryggvadottir, S.V. (2002) Shelf life of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in liquid and flake ice studied by quality index method (QIM), electronic nose and texture. In *Proceedings of the 32nd Annual Meeting*. Galway, Ireland.

Massa, A.E., Manca, E. and Yeannes, M.I. (2012) Development of Quality Index Method for anchovy (*Engraulis anchoita*) stored in ice: assessment of its shelf-life by chemical and sensory methods. *Food Sci. Technol. Int.*, 18(4):339-351.

Matejkova, K.; Krizek, M.; Vacha, F. and Dadakova, E. (2013) Effect of high-pressure treatment on biogenic amines formation in

vacuum-packed trout flesh (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Chem.*, 137:31-36.

Mathew, S., and Raghunath, M. R. (1996). Leaching of protein and other nitrogenous compound during brine curing of mackerel. *Fish. Technol.*, 33:69-71.

Mathiassen, J. R., Misimi, E., Bondø, M., Veliyulin, E., and Østvik, S. O. (2011). Trends in application of imaging technologies to inspection of fish and fish products. *Trends in Food Science & Technology*, 22(6):257-275.

Matsumoto, M. and Yamanaka, H. (1991) Post mortem biochemical changes in the muscle of kuruma prawn during storage and evaluation of the freshness. *Nip.Sui.Gak.*, 56:

Mbarki, R., Sadok, S. and Barkallah, I. (2009) Changes quality of the Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) during chilled storage: the effect of low-dose gamma irradiation. *Radiat.Phy.Chem.*, 78(4):288-292.

McDonald, D. G., Milligan, C. L., McFarlane, W. J., Croke, S., Currie, S., Hooke, B., and Davidson, K. (1998). Condition and performance of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*): effects of rearing practices on hatchery fish and comparison with wild fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55(5):1208-1219.

Medina, I., Aubourg, S., and Gallardo, J. M. (2000). Evolution of capillary zone electrophoresis profiles of methanol soluble compounds during fish chilling: relation to freshness. *European Food Research and Technology*, 210(5):353-358.

Medina, I., Gallardo, J.M. and Aubourg, S.P. (2009) Quality preservation in chilled and frozen fish products by employment of slurry ice and natural antioxidants. *Int.J.Food Sci.Technol.*, 44:1467-1479.

Medina, I., González, M. J., Iglesias, J., and Hedges, N. D. (2009). Effect of hydroxycinnamic acids on lipid oxidation and protein changes as well as water holding capacity in frozen minced horse mackerel white muscle. *Food Chemistry*, 114(3):881-888.

Meilgaard, M. C., Carr, B. T., and Civille, G. V. (2006). Sensory evaluation techniques. CRC press., Boca Raton

Mejlholm, O., and Dalgaard, P. (2002). Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology*, 34(1):27-31.

Mejlholm, O., and Dalgaard, P. (2007). Modeling and predicting the growth boundary of *Listeria monocytogenes* in lightly preserved seafood. *Journal of Food Protection*, 70(1):70-84.

Ménard, C. (2006). *La pesca gallega en Terranova, siglos XVI-XVIII*. Univ Santiago de Compostela.

Mendes, R. (1999). Changes in biogenic amines of major Portuguese bluefish species during storage at different temperatures. *Journal of Food Biochemistry*, 23(1):33-43.

Mendes, R., Pestana, C. and Gonçalves, A. (2008) The effects of soluble gas stabilization on the quality of packed sardine fillets (*Sardina pilchardus*) stored in air, VP and MAP. *Int.J.Food Sci.Technol.*, 43:2000-2009.

Mendes, R., Quinta, R., and Nunes, M. L. (2001). Changes in baseline levels of nucleotides during ice storage of fish and crustaceans from the Portuguese coast. *European Food Research and Technology*, 212(2):141-146.

Méndez, I. M., Manuel, J., and Abuín, G. (2006). Thermal Processing of Fishery Products. En *Thermal Food Processing*.

MERCASA (2012) Informe Anual, MERCASA, Madrid.

MERCASA (2016) Informe Anual, MERCASA, Madrid.

Mexis, S.F.; Chouliara, E. and Kontominas, M.G. (2009) Combined effect of an oxygen absorber and oregano essential oil on shelf life extension of rainbow trout fillets stored at 4°C. *Food Microbiology*, 26(6):598-605.

Mietz, J. L., and Karmas, E. (1978). Polyamine and histamine content of rockfish, salmon, lobster, and shrimp as an indicator of decomposition. *Journal of the AOAC* 61(1):139-145.

Mochizuki, S. and Sato, A. (1996) Effect of various killing procedures on postmortem changes in the muscle of chub mackerel and round scad. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 62:453-457.

Mochizuki, S., Norita, Y., and Maeno, K. (1998), Effects of bleeding on postmortem changes in the muscle of horse mackerel. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 64:276-279.

Mohammad, S. H., and Yusuf, M. S. (2016). Proximate evaluation of some economical seafood as a human diet and as an alternative prospective valuable of fish meal. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 11(1): 12.

Mohan, C. O., Ravishankar, C. N., Bindu, J., Geethalakshmi, V., and Srinivasa-Gopal, T. K. (2006). Effect of thermal process time on quality of “*shrimp kuruma*” in retortable pouches and aluminum cans. *Journal of Food Science*, 71(6).

Mohan, C. O., Ravishankar, C. N., Lalitha, K. V., and Gopal, T. S. (2012). Effect of chitosan edible coating on the quality of double filleted Indian oil sardine (*Sardinella longiceps*) during chilled storage. *Food Hydrocolloids*, 26(1):167-174.

Mohan, C. O., Remya, S., Murthy, L. N., Ravishankar, C. N., and Kumar, K. A. (2015). Effect of filling medium on cooking time and quality of canned yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Food Control*, 50:320-327.

Montville, T.J.; Winkowski, K. and Ludescher, R.D. (1995) Models and mechanisms for bacteriocin action and application. *International Dairy Journal*, 5(8):797-814.

Mora, L., Hernández-Cazares, A.S., Aristoy, M.C. and Toldrá, F. (2010) Hydrophilic interaction chromatographic determination of adenosine triphosphate and its metabolites. *Food Chem.*, 123:1282-1288.

Morkore, T., Rodbotten, M., Vogt, G., Fjaera, S.O., Kristiansen, I.O and Manseth, E. (2010) Relevance of season and nucleotide catabolism on changes in fillet quality during chilled storage of raw Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Food Chem.*, 119:1417-1425.

Morrow, J. D., Margolies, G. R., Rowland, J., and Roberts, L. J. (1991). Evidence that histamine is the causative toxin of scombroid-fish poisoning. *New England Journal of Medicine*, 324(11):716-720.

Munshi, A. B., Ali, S. A., and Shakir, S. (2005). Seasonal Variations in Biochemical Composition of Sardines. *Jour. Chem. Soc. Pak.*, 27(2).

Murray, J. and Thomson A.B. (1983) Reverse phase ion par separation of nucleotides and related products in fish muscle *J.H. Resol. Chromat.*, pag: 209-210.

Murray, J. M., Delahunty, C. M., and Baxter, I. A. (2001). Descriptive sensory analysis: past, present and future. *Food Research International*, 34(6):461-471.

Muscarella, M., Iammarino, M., Centonze, D., and Palermo, C. (2005). Measurement of histamine in seafood by HPLC, CE, and ELISA: comparison of three techniques. *Veterinary Research Communications*, 29(2):343-346.

Nagata, C., Wada, K., Tamura, T., Konishi, K., Kawachi, T., Tsuji, M., and Nakamura, K. (2015). Choline and Betaine Intakes Are Not Associated with Cardiovascular Disease Mortality Risk in Japanese Men and Women²³. *The Journal of Nutrition*, 145(8):1787-1792.

Nakano, M. (2015). Development of a quantitative PCR assay for thermophilic spore-forming *Geobacillus stearothermophilus* in canned food. *Biocontrol Sci.*, 20:221-227.

Nalan, G; Ozkan, O., and Nuray, E. (1998) Physical, chemical and sensory analyses of freshly harvested sardines (*Sardina pilchardus*) stored at 4°C. *J. Aquat. Food Prod. Technol.*, 7:5-15.

Navarro, M. P., and García-Arias, M. (1996). Tuna protein nutritional quality changes after canning. *Journal of Food Science*, 61(6):1250-1253.

Nilsen, H., & Esaiassen, M. (2005). Predicting sensory score of cod (*Gadus morhua*) from visible spectroscopy. *LWT-Food Science and Technology*, 38(1), 95-99.

Nilsen, H.A. and Heia, K. (2009) VIS/NIR spectroscopy. In: *Fishery Products: quality, safety and authenticity*. Ed Rehbein, H. and Oehhlenschläger, J., Wiley-Blackwell, Oxford. Pag: 89-104.

Nollet, L. M., and Toldrá, F. (2009). Handbook of seafood and seafood products analysis. CRC Press. Florida

Noordiana, N., Fatimah, A. B., and Farhana, Y. C. B. (2011). Formaldehyde content and quality characteristics of selected fish and seafood from wet markets. *International Food Research Journal*, 18(1).

Nordtvedt, T.S., Magnussen, O.M. and Johansen, S. (1996) The importance of chilling arrangements. In *Refrigeration and Aquaculture.*, Ed. Int.Inst.Refrigerat., pag:211-217.

Nuin, M., Alfaro, B., Cruz, Z. and Argarate, N. (2006) Time temperature indicators as quality and shelf-life indicators for fresh turbot (*Psetta maxima*). En *Seafood research from fish to dish*. Eds. Luten, J.B., Jacobsen, C., Bekaert, K., Saebo, A. and Oehlenschläger, J. Wageningen Academic Publishers, Wageningen.

Nunes, M.L.; Batista, I. and Morao de Campos, R. (1992) Physical, chemical and sensory analysis of sardine (*Sardina pilchardus*) stored in ice. *J.Sci.Food Agric.*, 59:37-43.

Oba, K. and Niwa, E. (1993) The mode of inhibition by salts to two enzymes involved in IMP degradation in fish fresh. *Nip. Shok. Gak.*, 40(8):583-588.

Obatake, A., Doi, T. and Ono, T. (1988) Postmortem degradation of inosinic acid and related enzyme activity in the dark muscle of fish. 54:283-288.

Obatake, A.; Doi, T. and Itoh, Y (1988b) Purification and properties of acid phosphomonoesterase from the dark muscle of common mackerel. *Nip. Sui. Gak.*, 53-568.

Ocaño-Higuera, V. M., Maeda-Martínez, A. N., Marquez-Ríos, E., Canizales-Rodríguez, D. F., Castillo-Yáñez, F. J., Ruíz-Bustos, E. and Plascencia-Jatomea, M. (2011). Freshness assessment of ray fish stored in ice by biochemical, chemical and physical methods. *Food Chemistry*, 125(1):49-54.

Ochrem, A. S., Zapletal, P., Maj, D., Gil, Z., and Żychlińska-Buczek, J. (2014). Changes in physical and dielectrical properties of carp meat (*Cyprinus carpio*) during cold storage. *Journal of Food Process Engineering*, 37(2):177-184.

Odlaug, T.E., and Pflug, I.J. (1977). Thermal destruction of *Clostridium botulinum* spores suspended in tomato juice in aluminum thermal death time tubes. *Applied and Environmental Microbiology*, 34(1):23-29.

Oehlenschläger, J. (1997) Suitability of ammonia-n, dimethylamine-n, trimethylamine-n, trimethylamine oxide-n and total volatile basic nitrogen as freshness indicators in seafoods. En *Methods*

to determine the freshness of fish in research and industry. Eds. Olafsdottir, G.; Luten, J.B., Dalgaard, P., Careche, M., Verrez, V., Martinsdottir, E. and Heia, K. Proceedings of the final meeting of the concerted action "Evaluation of Fish Freshness" AIR3CT94 2283, Nantes, pag:92-99.

Oehlenschläger, J. (2014). Seafood quality assessment. En *Seafood Processing: Technology, Quality and Safety*, pag: 359-386.

Okuzumi, M., and Awano, M. (1983). Seasonal variations in numbers of psychrophilic and halophilic histamine-forming bacteria (N-group bacteria) in seawater and on marine fishes. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 49:1285-1291.

Olafsdottir, G., Martinsdóttir, E., Oehlenschläger, J., Dalgaard, P., Jensen, B., Undeland, I., and Nilsen, H. (1997). Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends in Food Science & Technology*, 8(8):258-265.

Olafsdottir, G.; Verrez, V., Luten, J.B., Dalgaard, P., Careche, M., Martinsdottir, E. and Heia, K. (1997) The need for methods to evaluate fish freshness. En *Methods to determine the freshness of fish in research and industry*. Eds. Olafsdottir, G.; Luten, J.B., Dalgaard, P., Careche, M., Verrez, V., Martinsdottir, E. and Heia, K. Proceedings of the final meeting of the concerted action "Evaluation of Fish Freshness" AIR3CT94 2283, Nantes, pag:17-29.

Olivas-Gastélum, R., Nevárez-Moorillón, G. V., and Gastélum-Franco, M. G. (2009). Las pruebas de diferencia en el análisis sensorial de los alimentos. *Tecnociencia Chihuahua*, 3(1):1-7.

Önal, A., Tekkeli, S. E. K., and Önal, C. (2013). A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food chemistry*, 138(1):509-515.

Oyelese, O.A. and Opatokun, M.O. (2007) Exposure time on bacteria flora/count and shelf life of canned sardine (*Sardinella pilchardus*) under ambient and cold storage conditions. *J. Food Proc. Preserv.* , 31:517-530.

Ozogul, F. and Ozogul, Y. (2005) Formation of biogenic amines by Gram-negative rods isolated from fresh, spoiled, VP-packed and MAP-packed herring (*Clupea harengus*). *Eur. Food Res. Technol.*, 221:575-581.

Özogul, F., and Özogul, Y. (2007). The ability of biogenic amines and ammonia production by single bacterial cultures. *European Food Research and Technology*, 225(3-4):385-394.

Ozogul, F., Polat, A. and Ozogul, Y. (2004) The effects of modified atmospheres packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*). *Food Chem.*, 85:49-57.

Ozogul, F., Taylor, K.D., Quantick, P. and Ozogul, Y. (2002) Biogenic amines formation in Atlantic herring (*Clupea harengus*) stored under modified atmosphere packaging using a rapid HPLC method. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 37:515-522.

Ozogul, F., Taylor, K.D., Quantick, P.C., and Ozogul, Y. (2000a), A rapid HPLC-determination of ATP-related compounds and its application to herring stored under modified atmosphere. *Int. J. Food Sci.*, 35(6):549-554.

Ozogul, F.; Taylor, K.D.A., Quantick, P. and Ozogul, Y. (2000b) Chemical, microbiological and sensory evaluation of Atlantic herring (*Clupea harengus*) stored in ice, modified atmosphere and vacuum pack. *Food Chem.*, 71:267-273.

Ozogul, Y. and Balikci, E. (2013) Effect of various processing methods on quality of mackerel (*Scomber scombrus*). *Food Bioproc. Technol.*, 6(4):1091-1098.

Ozogul, Y., Durmus, M., Balikci, E., Ozogul, F., Ayas, D. and Yazgan, H. (2011) The effects of the combination of freezing and the use of natural antioxidant technology on the quality of frozen sardine fillets (*Sardinella aurita*). *Int. J. Food Sci. Technol.*, 46:236-242.

Ozogul, F., Ozden, O., Ozogul, Y. and Erkan, N. (2010a) The effects of gamma-irradiation on the nucleotide degradation compounds in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Food Chem.*, 122:789-794.

Ozogul, F., Ozden, O., Ozogul, Y. and Erkan, N. (2010b) Nucleotide degradation products of gamma-irradiation sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 45:2290-2296.

Özyurt, G., and Polat, A. (2006). Amino acid and fatty acid composition of wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): a seasonal

differentiation. *European Food Research and Technology*, 222(3-4):316-320.

Ozyurt, G.; Kuley, E.; Balikci, E.; Kacar, C.; Gokdogan, S.; Etyemez, M. and Ozogul, F. (2012) Effect of icing with rosemary extract on the oxidative stability and biogenic amine formation in sardine (*Sardinella aurita*) during chilled storage. *Food Bioproc.Technol.*, 5(7):2777-2786.

Pacetti, D., Balzano, M., Colella, S., Santojanni, A. and Frega, N.G. (2013) Effect of spawning on furan fatty acid profile of edible muscle and organ tissues from sardine (*Sardina pilchardus*) and anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *J. Agric. Food Chem.*, 61:3969-3977.

Pacheco-Aguilar, R., Lugo-Sánchez, M.E. and Robles-Burgueño, M.R. (2000) Postmortem biochemical and functional characteristic of Monterey sardine muscle stored at 0°C. *J.Food Sci*, 65(1):40-47.

Pacheco-Aguilar, R., Lugo-Sánchez, M.E., Villegas-Osuna, R.E. and Robles-Burgueño, R. (1998). Histamine formation in muscle of sardine and its quantification in canned products from Northwestern Mexico. *J.Food Comp.Anal.*, 11:188-195.

Pal, G. K., and Suresh, P. V. (2016). Sustainable valorisation of seafood by-products: recovery of collagen and development of collagen-based novel functional food ingredients. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37:201-215.

Paleologos, E. K., Savvaidis, I. N., and Kontominas, M. G. (2004). Biogenic amines formation and its relation to microbiological and sensory attributes in ice-stored whole, gutted and filleted Mediterranean Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Food Microbiology*, 21(5):549-557.

Papadopoulos, V., Chouliara, I., Badeka, A., Savvaidis, I.N. and Kontominas, M.G. (2003). Effect of gutting on microbiological, chemical and sensory properties of aquaculture sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Food Microbiol.*, 20:414-420.

Papageorgiou, M., Lambropoulou, D., Morrison, C., Kłodzińska, E., Namieśnik, J., and Płotka-Wasyłka, J. (2017). Literature update of analytical methods for biogenic amines determination in food and beverages. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*.

Parchami, R., Kamalabadi, M., and Alizadeh, N. (2017). Determination of biogenic amines in canned fish samples using head-space solid phase microextraction based on nanostructured polypyrrole fiber coupled to modified ionization region ion mobility spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1481:37-43.

Parkin, K. L., and Hultin, H. O. (1986). Characterization of trimethylamine-N-oxide (TMAO) demethylase activity from fish muscle microsomes. *The Journal of Biochemistry*, 100(1):77-86.

Parkin, K.; Wells, M.J. and Brown, W.D. (1981) Modified atmosphere storage of rockfish fillets. *J. Food Sci.*, 47:181-184.

Pascual, C. y Rodríguez, C.J. (2000) La refrigeración del pescado. En *La manipulación a bordo de pescado de la costera artesanal*. Eds Pascual, C y Díaz, M. Cofradía de Pescadores Santiago Apóstol, Viveiro. pag:145-154.

Pascual, C., Eiriz, M., Quintana, R. y Rodríguez, C. (1984) Evaluación de los stocks de sardina del NW español. *Alimentaria*, 158:53-65.

Pastor, X.; Alvarez, F.; Porteiro, C.; Astudillo, A. and Miguel, J. (1986) Acoustic abundance estimation of sardine (*Sardina pilchardus* Walb.) of Cantabric and Galician waters August 1985. In *Int.Counc. for Exploitation of the Sea, ICES*, Copenhagen (Denmark).

Pazos, M., Méndez, L., Fidalgo, L., Vázquez, M., Torres, J. A., Aubourg, S. P., and Saraiva, J. A. (2015). Effect of high-pressure processing of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) on biochemical changes during commercial frozen storage. *Food and Bioprocess Technology*, 8(10):2159-2170.

Pérez-Martin, R.I., Franco, J.M., Aubourg, S. and Gallardo, J.M. (1988) Changes in free amino acids content in albacore (*Thunnus alalunga*) muscle during thermal processing. *Z.Lebens.u.Forsch.*, 187:432-435.

Pérez-Villareal, B. and Pozo, R. (1990) Chemical composition and ice spoilage of albacore (*Thunnus alalunga*). *J.Food Sci.*, 55:678-682.

Perkins, W. E., Ashton, D. H., and Evancho, G. M. (1975). Influence of the z value of *Clostridium botulinum* on the accuracy of process calculations. *Journal of Food Science*, 40(6):1189-1192.

Peterson, M.E., Pelroy, G.A., Poysky, F.T., Paranjpye, R.N., Dong, F.M., Pigott, G.M., and Eklund, M. W. (1997). Heat-pasteurization process for inactivation of nonproteolytic types of *Clostridium botulinum* in picked Dungeness crabmeat. *Journal of Food Protection*, 60(8):928-934.

Pigott, G. (2017). *Seafood: effects of technology on nutrition*. Routledge.

Pigott, G. M., and Tucker, B. W. (1987). Science opens new horizons for marine lipids in human nutrition. *Food Reviews International*, 3(1-2):105-138.

Pigott, G.M. and Tucker, B.W. 1987. Science Opens New Horizons For Marine Lipids in Human Nutrition. *Food Reviews International*. 3 (1&2):105-138.

Pikul, J., Leszczynski, D. E., and Kummerow, F. A. (1989). Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(5):1309-1313.

Pilcher, J. M. (2017). *Food in World History*. Taylor and Francis Group, New York.

Piñeiro, C., Barros-Velázquez, J. and Aubourg, S. (2004). Effects of newer slurry ice systems on the quality of aquatic food products: a comparative review versus flake-ice chilling methods. *Trends Food Sci. Technol.*, 15:575-582.

Pink, J., Nacz, M., and Pink, D. (1998). Evaluation of the quality of frozen minced red hake: use of Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9):3667-3672.

Pivarnik, I. F., Kazantzis, D., Karakoltsidis, P. A., Constantinides, S., Jhaveri, S. N., and Rand, A. G. (1990). Freshness assessment of six New England fish species using the Torrymeter. *Journal of Food Science*, 55(1):79-82.

Pivarnik, L., Ellis, P., Wang, X., and Reilly, T. (2001). Standardization of the ammonia electrode method for evaluating seafood quality by correlation to sensory analysis. *Journal of Food Science*, 66(7):945-952.

Plowman, J., and Peck, M. W. (2002). Use of a novel method to characterize the response of spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum* types B, E and F to a wide range of germinants and conditions. *Journal of applied microbiology*, 92(4):681-694.

Poisson, F., Gaertner, J. C., Taquet, M., Durbec, J. P., and Bigelow, K. (2010). Effects of lunar cycle and fishing operations on longline-caught pelagic fish: fishing performance, capture time, and survival of fish. *Fishery Bulletin*, 108(3):268-281.

Poli, B. M., Parisi, G., Scappini, F., and Zampacavallo, G. (2005). Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. *Aquaculture International*, 13(1-2):29-49.

Pons, S., Bover, S., Veciana, M.T., and Vidal, M.C. (2005) Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from ice-preserved anchovies. *Eur. Food Res. Technol.*, 220:312-315.

Pons-Sánchez-Cascado, S., Vidal-Carou, M. C., Mariné-Font, A., and Veciana-Nogués, M. T. (2005). Influence of the freshness grade of raw fish on the formation of volatile and biogenic amines during the manufacture and storage of vinegar-marinated anchovies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22):8586-8592.

Porteiro, C.; Carrera, P., and Miquel J. (1996) Analysis of Spanish acoustic surveys for sardine, 1991-1993: abundance estimates and interannual variability. *ICES. J.Mar.Sci.*; 53:429-433.

Prester, L. (2016). Biogenic amines in ready-to-eat foods. En *Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods* (pp. 397-416).

Prochaska, L. J., Nguyen, X. T., Donat, N., and Piekutowski, W. V. (2000). Effects of food processing on the thermodynamic and nutritive value of foods: literature and database survey. *Medical Hypotheses*, 54(2):254-262.

Punzón, A. and Gancedo, R.M. (1998) Specific characterisation and identification of the fishing gears in use in the Cantabrian Sea (NE Atlantic, Northern Spain). *Int.Counc. for the Exploitation of the Sea, ICES*, Copenhagen (Denmark).

Punzón, A., Pereda, P., Villamor, B., and Gancedo, R. M. (1999). EVOLUCIÓN DE LAS PESQUERIAS PELÁGICAS Y DEMERSALES DE LA FLOTA DEL CANTABRICO ENTRE LOS AÑOS 1982-199

Pyrgotou, N., Giatrakou, V., Ntzimani, A. and Savvaidis, I.N. (2010) Quality Assessment of Salted, Modified Atmosphere Packaged Rainbow Trout under Treatment with Oregano Essential Oil. *J. Food Sci.*, 75(7):M406-M4

Rabie, M. A., Toliba, A. O., Sulieman, A. R., and Malcata, F. X. (2014). Changes in biogenic amine contents throughout storage of canned fish products. *Pakistan Journal of Food Sciences*, 24(3):137-150.

Raju, C.V.; Shamasundar, B.A. and Udupa, K.S. (2003) The use of nisin as a preservative in fish sausage stored at ambient (28 ± 2 °C) and refrigerated (6 ± 2 °C) temperatures. *International Journal of Food Science and Technology* 2003, 38, 171–185.

Ramos, S.; Re, P. and Bordalo, A.A. (2009) New insights into the early life ecology of *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) in the northern Iberian Atlantic. *Scientia Marina*, 73:449-459.

Rasmussen, R. S., Morrissey, M. T., and Roblero, J. (2008). Fatty Acid Composition of US West Coast Albacore Tuna (*Thunnus alalunga*) and the Effects of Canning and Short-Term Storage. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 17(4):441-458.

Rathore, R. M., Liaset, B., Hevrøy, E. M., El-Mowafi, A., and Espe, M. (2010). Lysine limitation alters the storage pattern of protein, lipid and glycogen in on-growing Atlantic salmon. *Aquaculture Research*, 41(11).

Reddy, N. R., Skinner, G. E., and Oh, S. (2006). *Clostridium botulinum* and its control in low-acid canned foods. *Food Science and Biotechnology*, 15(4):499-505.

Reddy, N.R., Roman, M.G., Villanueva, M., Solomon, H.M., Kautter, D.A., and Rhodehamel, E.J. (1997) Shelf life and *Clostridium botulinum* toxin development during storage and modified atmosphere-packaging fresh catfish fillets. *J. Food Sci.*, 62:878-884.

Refsgaard, H. H., Brockhoff, P. M., and Jensen, B. (2000). Free polyunsaturated fatty acids cause taste deterioration of salmon during frozen storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8):3280-3285.

Reineccius, G. A. (1979). Symposium on meat flavor off-flavors in meat and fish-a review. *Journal of Food Science*, 44(1):12-24.

Rey-Mansilla, M.M. (2002) Alteración de la merluza europea (*Merluccius merluccius*, L.) conservada en estado congelado: estudio de la actividad óxido de trimetilamina aldolasa (EC. 4.1.2.32). Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela.

Rezaei, M., Montazeri, N., Langrudi, H. E., Mokhayer, B., Parviz, M., and Nazarinia, A. (2007). The biogenic amines and bacterial changes of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) stored in ice. *Food Chemistry*, 103(1):150-154.

Risso, S. J., Crovetto, C., Ávila, A., and Gutiérrez, M. I. (2017). Fluorescence of Extracts from Argentine Hake (*Merluccius hubbsi*) Muscle and Its Correlation with Quality Indices During Chilled Storage. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 26(2):215-223.

Robb, D.H.F. (2001) The relationship between killing methods and quality. En: *Farmed Fish Quality*, Kestin, S.C. and Warris, P.D. Eds, *Fishing News Books*, Oxford, pag:220-233.

Robles-Burgueño, M.R. (1993). Caracterización química, bioquímica y tecnológica del músculo de sardina Monterrey (*Sardinops sagax caerulea*). Master Dissertation. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Son. Mexico

Rodríguez, A., Carriles, N., and Aubourg, S.P. (2010) Effect of chill storage under different icing conditions on sensory and physical properties of canned farmed salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Food Sci. Technol.*, 45:295-304.

Rodríguez, A., Carriles, N., Gallardo, J.M., and Aubourg, S.P. (2009) Chemical changes during farmed coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) canning: effect of a preliminary chilled storage. *Food Chem.*, 112:362-368.

Rodríguez, C., Masoud, T. and Huerta, M.D. (1997) Variaciones cuali y cuantitativas de los parámetros utilizados para evaluar la calidad del pescado, cuando éste se somete a procesos térmicos. *Alimentaria*, 288:121-123.

Rodríguez, C.J. (2000a) El pescado como alimento. Especies comerciales. En *La manipulación a bordo de pescado de la costera*

artesanal. Eds Pascual, C y Díaz, M. Cofradía de Pescadores Santiago Apóstol, Viveiro. pag:93-104.

Rodríguez, C.J. (2000b) La utilización de sistemas rápidos de enfriamiento. En *La manipulación a bordo de pescado de la costera artesanal*. Eds Pascual, C y Díaz, M. Cofradía de Pescadores Santiago Apóstol, Viveiro. pag:155-163.

Rodríguez, C.J., Besterio, I. and Pascual, C. (1999) Biochemical changes in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chilled storage. *J.Sci.Food Agric.*, 79:1473-1480.

Rodríguez, C.J., Fernandez-Babarro, J. and Pascual, C. (1996) Evolución de los productos de degradación del ATP durante el proceso de elaboración de conservas de Sardina. *Alimentaria*, 274:81-85.

Rodríguez, C.J., Velasco, F., Besteiro, I., Rodríguez, S., Quintana, R. and Pascual, M.C. (1991) Evaluación sensorial y química de la sardina (*Sardina pilchardus*, Walb.) almacenada en hielo y cámara fría. *Alimentaria*, 219:87-92.

Rodríguez, C.J., Villar-Estalote, V., Besteiro, I. and Pascual, C. (1997) Biochemical indices of freshness during processing of sardine (*Sardina pilchardus*, Walb.) for canning. In *Seafood from Producer to Consumer, Integrated Approach to Quality*, Eds. Luten, J.B., Borrensen, T. and Oehlenschläger, J.; Elsevier, Amsterdam, pag:203-210.

Rodríguez, O., Barros-Velázquez, J., Piñeiro, C., Gallardo, J.M. and Aubourg, S.P. (2006) Effects of storage in slurry ice on the microbial, chemical and sensory and on the shelf life of farmed turbot (*Psetta maxima*). *Food Chem.*, 95:270-278.

Rodríguez, O., Losada, V., Aubourg, S.P. and Barros-Velázquez, J. (2004) Enhanced shelf-life of chilled European hake (*Merluccius merluccius*) stored in slurry ice as determined by sensory analysis and assessment of microbial activity. *Food Res.Int.*, 37:749-757.

Rodríguez, O., Losada, V., Aubourg, S.P. and Barros-Velázquez, J. (2005) Sensory, microbial and chemical effects of a slurry ice system on horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *J.Sci.Food Agric.*, 85:235-242.

Rodríguez-Jerez, J.J., López-Sabater, I.E., Hernández-Guerrero, M.M. and Mora-Ventura, M.T., 1994b. Histamine, putrescine and cadaverine formation in Spanish semipreserved anchovies as affected by time/temperature. *J. Food Sci.*, 59:993-997.

Rodríguez-Jerez, J.J., López-Sabater, I.E., Roig-Sagues, A.X. and Mora-Ventura, M.T., 1994a. Histamine, putrescine and cadaverine forming bacteria from ripened Spanish semipreserved anchovies in Spanish semipreserved anchovies. *J. Food Sci.*, 59:998-1001.

Romaní, A. (1997) Unha Industria salgadeira catalana en Galicia: Orixe, apoxeo e ocaso. Xunta de Galicia.

Ronholm, J., Lau, F., and Banerjee, S. K. (2016). Emerging seafood preservation techniques to extend freshness and minimize *Vibrio* contamination. *Frontiers in Microbiology*, 7:350.

Ruíz, C. and Jiménez, F. (2004). Biogenic amine content in Spanish retail market meat products treated with protective atmosphere and high pressure. *Eur. Food Res. Technol.*, 218:237-241

Ruíz-Capillas, C and Moral, A. (2001). Correlation between biochemical and sensory quality indices in hake stored in ice. *Food Res. Int.*, 34:441-447.

Ruiz-Capillas, C., and Horner, W.F.A. (1999). Determination of trimethylamine nitrogen and total volatile basic nitrogen in fresh fish by flow injection analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(14):1982-1986.

Ruiz-Capillas, C., Gillyon, C.M. and Horner, W.F. (2001). Determination of different volatile base components as quality control indices in fish by official methods and flow injection analysis. *Journal of Food Biochemistry*, 25(6):541-553

Ruiz-Capillas, C., Triki, M., de las Heras, C., Tejada, M., Pálmadóttir, H., Porvaldsdóttir, R., and Herrero, A. M. (2015). Essay of different extraction procedures in capelin fish meal for biogenic amine determination by HPLC. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 24(5):443-453.

Ryder, J.M. (1985) Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish muscle by high-performance Liquid Chromatography. *J.Agric.Food Chem.*, 33:678-680.

Ryder, J.M., Fletcher, G.C., Stec, M.G. and Seelye, R.J. (1993) Sensory, microbiological and chemical changes in Hoki stored in ice. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 28:169-180.

Saito, H. and Udagawa, M. (1992) Assessment of oxidative deterioration of salted dried fish by nuclear-magnetic-resonance. *JAOCs*, 69:1157-1159.

Saito, T., Arai, K. and Matsuyoshi, M. (1959) A new method for estimating the freshness of fish. *Bull.Jap.Soc.Sci.Fish.*, 24:749-750.

Sakaguchi, M., Murata, M., and Kawai, A. (1982). Changes in free amino acids and creatine contents in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) muscle during ice storage. *Journal of Food Science*, 47(5):1662-1666.

Samaha, I.A., Elgazzar, M.M. and El-Atabany, A.I. (1997) Histamine content in sardine and its products. *J. Egyp. Public Health*, 72(5-6):471-478.

Samerotte, A. L., Drazen, J. C., Brand, G. L., Seibel, B. A., and Yancey, P. H. (2007). Correlation of trimethylamine oxide and habitat depth within and among species of teleost fish: an analysis of causation. *Physiological and Biochemical Zoology*, 80(2):197-208.

Sampels, S. (2015). The effects of processing technologies and preparation on the final quality of fish products. *Trends in Food Science & Technology*, 44(2):131-146.

San Roman, I., Luz Alonso, M., Bartolomé, L., and M Alonso, R. (2014). Headspace gas chromatography methods and their potential industrial applications. *Current Chromatography*, 1(2):100-121.

Sanchez, S., Palomera, I., Albo-Puigserver, M., and Bernal, M. (2013) Energy density and lipid content of sardine (*Sardina pilchardus*) and anchovy (*Engraulis encrasicolus*) in the catalan sea, northwestern Mediterranean Sea. *Rapp. Comm. Int. Mer Médit.*, 40:530.

Sánchez-Zapata, E., Amensour, M., Oliver, R., Navarro, C., Fernández-López, J., Sendra, E., and Pérez-Alvarez, J. A. (2011). Quality characteristics of dark muscle from yellowfin tuna *Thunnus albacares* to its potential application in the food industry. *Food and Nutrition Sciences*, 2(01):22.

Sanjuás Rey, M.; García-Soto, B.; Fuertes-Gamundi, J.R.; Aubourg, S. and Barros-Velázquez, J. (2012) Effect of a natural organic acid-icing system on the microbiological quality of commercially relevant chilled fish species. *LWT-Food Science and Technology*, 46(1):217-223.

Sanjuás-Rey, M., Barros-Velázquez, J. and Aubourg, S.P. (2011) Effect of different icing conditions on lipid damage development in chilled horse mackerel (*Trachurus trachurus*) muscle. *Grasas y Aceites* 62(4):436-442.

Santos, A.M.P.; Chicharo, A.; dos Santos, A.; Moita, T.; Oliveira, P.B. (2007) Physical-biological interactions in the life history of small pelagic fish in the Western Iberia upwelling ecosystem. *Progress in Oceanography*, 74:192-209.

Santos, M. S. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29(2-3):213-231.

Sawyer, F.M., Cardello, A. V., and Prell, P.A. (1988). Consumer evaluation of the sensory properties of fish. *Journal of Food Science*, 53(1):12-18.

Schmidt, C. F., Lechowich, R. V., and Folinazzo, J. F. (1961). Growth and toxin production by type E *Clostridium botulinum* below 40 F. *Journal of Food Science*, 26(6):626-630.

Schubring, R. and Meyer, C. (2006a) Ice storage of fish, new aspects: comparison between flake ice and stream ice. Part I: Sardine (*Sardina pilchardus*). *Deuts.Lebens.Runds.*, 102(9):405-415.

Schubring, R. (2009) Colour measurement. En *Fishery Products-Quality, Safety and Authenticity*, Eds. Rehbein, H. and Oehlenschläger, J. Wiley-Blackwell, Oxford, pag:127-172.

Schubring, R. (2010) Quality assessment of fish and fishery products by color measurement. In *Handbook of seafood and seafood Products Analysis*. Eds. Nollet, L.M.L. and Toldrá, F. CRC Press, Boca Raton, pag:395-424.

Schubring, R. and Meyer, C. (2006b) Iced storage of fish, new aspects: comparison between flake ice and StreamIce. Part II: horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *Deut.Lebens.Runds.*, 102(11):508-517.

Sciuto, S., Esposito, G., Fazio, G., Magnani, L., Ubaldi, P. G., Martucci, F., and Acutis, P. L. (2016). Simultaneous determination of biogenic amines as indicators of freshness in fish by direct analysis of the sample with high resolution mass spectrometry [Conference poster]. In *XVII Congresso Nazionale SI Di. LV, Pacengo di Lazise (VR), Italia, 28-30 settembre 2016* (pp. 310-311). Società Italiana di Diagnostica di Laboratorio Veterinaria (SIDiLV).

Segtnan, V. H., Høy, M., Sørheim, O., Kohler, A., Lundby, F., Wold, J. P., et al. (2009). Noncontact salt and fat distributional analysis in salted and smoked 488 salmon fillets using X-ray computed Tomography and NIR interactance imaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:1705-1710.

Selmi, S. and Sadok, S. (2007) Change in lipids quality and fatty acids profile of two small pelagic fish: *Sardinella aurita* and *Sardine pilchardus* during canning process in olive oil and tomato sauce respectively. *Bull. Inst. Natn. Scien. Tech. Mer de Salammbô*, 34:91-97.

Sen, N. P., Tessier, L., Seaman, S. W., and Baddoo, P. A. (1985). Volatile and nonvolatile nitrosamines in fish and the effect of deliberate nitrosation under simulated gastric conditions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 33(2):264-268.

Şengör, G. F. Ü., Kalafatoğlu, H., and GÜN, H. (2004). The determination of microbial flora, water activity and chemical analyses in smoked, canned mussels (*Mytilus galloprovincialis*, L.). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28(5):793-797.

Sentellas, S., Núñez, O., and Saurina, J. (2016). Recent advances in the determination of biogenic amines in food samples by (U) HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(41):7667-7678.

Sevenier, V.; Delannoy, S.; André, S.; Fach, P. and Remize, F. (2012) Prevalence of *Clostridium botulinum* and thermophilic heat-resistant spores in raw carrots and green beans used in French canning industry. *International Journal of Food Microbiology*, 155(3):263-268.

Shahidi, F. (1994). Seafood proteins and preparation of protein concentrates. En *Seafoods: Chemistry, processing technology and quality*. Springer, Boston, pag:3-9.

Shahidi, F. (2016). Oxidative Stability and Shelf Life of Meat and Meat Products. En *Oxidative stability and shelf life of foods containing oils and fats*. pag: 373-389.

Shakila, R.J., Jeyasekaran, G., Vyla, S.A.P. and Kumar, R.S. (2005) Effect of delayed processing on changes in histamine and other quality characteristics of 3 commercially canned fishes. *J. Food Sci.*, 70(1):24-29.

Shakila, R.J., Vijayalakshmi, K. and Jeyasekaran, G. (2003). Changes in histamine and volatile amines in six commercially important species of fish of the Thoothukkudi coast of Tamil Nadu, India stored at ambient temperature. *Food Chem.*, 82:347-352.

Shalaby, A. R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 29(7):675-690.

Shewan, J.M.; Macintosh, R.G.; Tucker, C.G. and Ehrenberg, A.S.C. (1953) The development of a numerical scoring system for the sensory assessment of the spoilage of wet white fish stored in ice. *J.Sci. Food Agric.*, 4:283-298.

Shirai, N., Terayama, M. and Takeda, H. (2002) Effect of season on the fatty acids composition and free aminoacid content of the *Sardinops melanostictus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Molec. Biol.*, 131:387-393.

Shirai, T., Fuke, S., Yamaguchi, K., and Konosu, S. (1988). Nucleotides, quaternary ammonium bases, and related compounds in the raw and heated muscles of salmon. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* (Japan). 54:1199-

Shirazinejad, A. R.; Noryati, I.; Rosma, A. and Darah, I. (2010) Inhibitory Effect of Lactic Acid and Nisin on Bacterial Spoilage of Chilled Shrimp. World Academy of Science. *Engineering and Technology*, 41:163-167.

Sikorski, Z. and Kostuch, S. (1982). Trimethylamine N-oxide demethylase: its occurrence, properties, and role in technological changes in frozen fish. *Food Chemistry*, 9(3):213-222.

Sikorski, Z. E., and Kołakowski, E. (2000). Endogenous Enzyme Activity and Seafood Quality: Influence of Chilling, Freezing, and Other. En *Seafood enzymes: Utilization and influence on postharvest seafood quality*, pag:451-.

Sikorski, Z.E. and Kolakowska, A. (1990) Freezing of marine food. In: “*Seafood: Resources, nutritional composition, and preservation*”. Z.E. Sikorski (Ed.). CRC Press. Inc. Boca Raton, Fl. p. 112-124.

Sikorski, Z.E., Kolakowska, A. and Burt J.R. (1990). Postharvest biochemical and microbial changes. In: “*Seafood: Resources, nutritional composition, and preservation*”. Z.E. Sikorski (Ed.), CRC Press. Inc. Boca Raton, Fl. pag. 55-75.

Sikorski, Z.E.; Kolakowka, A. and Burt, B.S. (1994) Cambios bioquímicos y microbianos subsiguientes a la captura. En *Tecnología de los Productos del Mar*. Ed. Sikorski, Z.E., Ed ACRIBIA, Zaragoza, pag 73-101.

Silbande, A., Adenet, S., Smith-Ravin, J., Joffraud, J. J., Rochefort, K., and Leroi, F. (2016). Quality assessment of ice-stored tropical yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and influence of vacuum and modified atmosphere packaging. *Food microbiology*, 60:62-72.

Silva, C. C., Ponte, D. J., and Dapkevicius, M. L. E. (1998). Storage temperature effect on histamine formation in big eye tuna and skipjack. *Journal of Food Science*, 63(4):644-647

Silva, F.V., and Gibbs, P.A. (2010). Non-proteolytic *Clostridium botulinum* spores in low-acid cold-distributed foods and design of pasteurization processes. *Trends in Food Science & Technology*, 21(2):95-105.

Silva, F.V.M. and Gibbs, P.A. (2010) Non-proteolytic *Clostridium botulinum* spores in low-acid cold-distributed foods and design of pasteurization processes. *Trends in Food Science and Technology*, 21:95-105.

Silva, J. J., and Chamul, R. S. (2000). Composition of marine and freshwater finfish and shellfish species and their products. En *Marine and Freshwater Products Handbook*, pag:31-46.

Silva, N.; Gonçalves, A.; Amaral, J.S. and Poeta, P. (2013) Antimicrobial activity of essential oils from mediterranean aromatic

plants against several foodborne and spoilage bacteria. *Food Sci. Technol. Int.*, 26.

Šimat, V., Maršić-Lučić, J., Tudor, M., and Mladineo, I. (2009). Long-term storage influence on volatile amines (BVT-N and TMA-N) in sardines and herring utilized as food for tuna fattening. *Journal of Applied Ichthyology*, 25(6):766-770.

Simeonidou, S.; Govaris A. and Vareltsis, K. (1997) Quality assessment of seven Mediterranean fish species during storage on ice. *Food Res.Int.*, 30:479-484.

Simpson, R., Almonacid, S., and Teixeira, A. (2003). Optimization criteria for batch retort battery design and operation in food canning-plants. *Journal of Food Process Engineering*, 25(6):515-538.

Sims, G.G.; Farn, G., and York, R.K. (1992) Quality indices for canned Skipjack Tuna: correlation of sensory attributes with chemical indices. *J. Food Sci.*, 57(5):1112-1115.

Singh, S., ho Lee, M., Shin, Y., and Lee, Y. S. (2016). Antimicrobial seafood packaging: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 53(6):2505-2518.

Sioen, I., De Henauw, S., Verdonck, F., Van Thuyne, N., and Van Camp, J. (2007). Development of a nutrient database and distributions for use in a probabilistic risk–benefit analysis of human seafood consumption. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(8):662-670.

Sivertsen, A. H., Kimiya, T., and Heia, K. (2011). Automatic freshness assessment of cod (*Gadus morhua*) fillets by Vis/Nir spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, 103(3):317-323.

Sivertsen, A., Heia, K., Stormo, S., Elvevoll, E., and Nilsen, H. (2011). Automatic nematode detection in cod fillets (*Gadus morhua*) by transillumination hyperspectral imaging. *Journal of Food Science*, 76(1):S77-S83.

Skjervold, P. O., Fjæra, S. O., and Østby, P. B. (1999). Rigor in Atlantic salmon as affected by crowding stress prior to chilling before slaughter. *Aquaculture*, 175(1-2):93-101.

Slabyj, B.M. and True, R.H. (1978) Effect of preprocess holding on the quality of canned Maine sardines. *J. Food Sci.*, 43:1172-1176.

Smith, J.G.M., Hardy, R.S.; McDonald, I. and Temoleton, J. (1980) The storage of herring (*Clupea harengus*) in ice, refrigerated sea water and at ambient temperature. Chemical and sensory assessment. *J.Sci.Food Agric.*, 31:375-385.

Soares, V.F.M. and Gloria, M.B.A. (1994) Histamine levels in canned fish available in Belo Horizonte, Minas Gerias, Brazil. *J. Food Comp. Anal.*, 7:102-109.

Soga, T., Ishikawa, T., Igarashi, S., Sugawara, K., Kakazu, Y. and Tomita, M. (2007). Analysis of nucleotides by pressure-assited capillary electrophoresis-mass spectrometry using silanol mask technique. *J. Chromatogr. A.*, 1159:125-133.

Sohn, J.H., Taki, Y., Ushio, H., Kohata, T., Shioya, I., and Ohshima, T. (2005). Lipid oxidations in ordinary and dark muscles of fish: Influences on rancid off-odor development and color darkening of yellowtail flesh during ice storage. *Journal of Food Science*, 70(7).

Sokal, R.R. y Rholf, F.J. (1979) *Biometría*, Ed. H. Blume, Madrid

Solomon, H. M., Lynt, R. K., Lilly Jr, T., and Kautter, D. A. (1977). Effect of low temperatures on growth of *Clostridium botulinum* spores in meat of the blue crab. *Journal of Food Protection*, 40(1):5-7.

Song, Y., Li, Z., Lin, H., Du, S., Hao, Z., Lin, H., and Zhu, Z. (2015). Effect of malondialdehyde treatment on the IgE binding capacity and conformational structure of shrimp tropomyosin. *Food Chemistry*, 175:374-380.

Sonu, S.C. (1986) *Surimi*. NOAA Technical Memorandum NMPS. U.S. Department of Commerce. Washington, D.C.

Sotelo, C. G., and Rehbein, H. (2000). TMAO-degrading enzymes. *Food Science And Technology*. MARCEL DEKKER. NEW YORK, pag: 167-190.

Spinelli, J. (1965) Effect of hypoxanthine on the flavour of fish and stored low-dose irradiated petrales ole fillets. *J. Food Sci.* 30:1063-1067.

Spinelli, J., Eklund, M. and Miyauchi, D. (1964) Measurement of hypoxanthine in fish as a method of assessing freshness. *J. Food Sci.*, 29:710-714.

Sreenath, P. G., Abhilash, S., Ravishankar, C. N., Anandan, R., and Srinivasa Gopal, T. K. (2009). Heat penetration characteristics and quality changes of Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) canned in brine at different retort temperatures. *Journal of Food Process Engineering*, 32(6):893-915.

Sriket, C. (2014). Proteases in fish and shellfish: Role on muscle softening and prevention. *International Food Research Journal*, 21(2).

Stamatis, N. and Arkoudelos, J. (2007) Quality assessment of *Scomber colias japonicus* under modified atmosphere and vacuum packaging. *Food control*, 18(4):292-300.

Stamatis, N. and Arkoudelos, J.S. (2007) Effect of modified atmosphere and vacuum packaging on microbial, chemical and sensory quality indicators of fresh, filleted *Sardina pilchardus* at 3°C. *J. Sci. Food Agric.*, 87:1164-1171.

Stammen, K., Gerdes, D., Caporaso, F., and Martin, R. E. (1990). Modified atmosphere packaging of seafood. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 29(5):301-331.

Stone, H. and Sidel, J.L. (2004) *Sensory evaluation practices*. 3Th Edición, Ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam. 377 pag.

Stratoudakis, Y., Coombs, S., Lago de Lanzós, A., Halliday, N., Costas, G., Caneco, B., Franco, C., Conway, D., Santos, M.B., Silva, A. and Bernal, M. (2007). *Sardina (Sardina pilchardus)* spawning seasonality in European waters of the northeast Atlantic. *Mar. Biol.*, 152:201-212.

Stratton, J.E., Hutkins, R.W. and Taylor, S.L. (1991). Biogenic amines in cheese and other fermented foods. A review. *J. Food Prot.*, 54:460-470.

Strom, A. R. (1979). Biosynthesis of trimethylamine oxide in calanoid copepods. Seasonal changes in trimethylamine monooxygenase activity. *Marine Biology*, 51(1):33-40.

Sukkon, P., Nalinanon, S., Yaiyen, S., and Areekul, V. (2016). Effects of temperature and time of incubation on the formation of histamine in bonito tuna flesh. *Food and Applied Bioscience Journal*, 4(2):97-106.

Summers, G., Wibisono, R. D., Hedderley, D. I., and Fletcher, G. C. (2017). Trimethylamine oxide content and spoilage potential of

New Zealand commercial fish species. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 51(3):393-405.

Surendran, P. K., and Gopakumar, K. (1982). The bacteriology of oil sardine (*Sardinella longiceps*) and mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) caught from tropical waters off Cochin-I-quantitative aspects.

Surette, ME., Gill, T.A., and LeBlanc, P.J.J. (1988) Biochemical basis of postmortem nucleotide catabolism in cod (*Gadus morhua*) and its relationship to spoilage. *J. Agric. Food Chem.*, 36:19-22.

Suzzi, G., and Torriani, S. (2015). Biogenic amines in foods. *Frontiers in microbiology*, 6:472-.

Sveinsdóttir, K., Martinsdóttir, E., Green-Petersen, D., Hyldig, G., Schelvis, R., and Delahunty, C. (2009). Sensory characteristics of different cod products related to consumer preferences and attitudes. *Food Quality and Preference*, 20(2):120-132.

Szczesniak, A.S. (1998) Sensory texture profiling-historical and scientific perspectives. *Food Technol.*, 52:54-57.

Szczesniak, A.S. (2002) Texture is a sensory property. *Food Quality and Preference*, 13:215-225.

Taguchi, T., Watanabe, N., Tanaka, M., Suzuki, K., Saito, A. and Ouchi, M. (1980). Quality evaluations of canned sardines. *Bull Jp. Soc. Sci. Fish.*, 46(6):739-742.

Tahergorabi, R., and Jaczynski, J. (2016). Seafood proteins and human health. In *Fish and Fish Oil in Health and Disease Prevention*, pag: 323-331

Tahergorabi, R., Hosseini, S. V., and Jaczynski, J. (2011). Seafood proteins. En *Handbook of food proteins*, pag: 116-149.

Tamimoto, S., Hirata, T. and Sakaguchi, M. (1999) The change in content of ATP and its related compounds in freshwater fish muscle during ice storage. *Nip. Sui. Gak.*, 65(1):97-102.

Tarladgis, B.G. and Watts, B.M. (1960) Malonaldehyde production during the controlled oxidation of pure unsaturated fatty acids. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 37:403-

Taylor, S. L., Stratton, J. E., and Nordlee, J. A. (1989). Histamine poisoning (scombroid fish poisoning): an allergy-like intoxication. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 27(4-5):225-240.

Taylor, S.L. (1986) Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. *CRC Crit. Rev.Toxicol.*, 17:91-117.

Taylor, S.L. and Summer, S.S. (1987) Determination of histamine, putrescine and cadaverine. En: *Seafood Quality Determination*, Kramer, D.T. and Liston, J. Eds., Elsevier Sci. Publis., Amsterdam, pag: 235-245.

Tejada, M. and Huidobro, A. (2002) Quality of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) during ice storage related to the slaughter method and gutting. *Eur.Food Res.Technol.*, 215:1-7.

Tejada, M., de las Heras, C. and Kent, M. (2007) Changes in the quality índices during ice storage of farmed senegaleses sole (*Solea senegalensis*). *Eu.Food Res.Technol.*, 225(2):225-232.

Tejada, M., Huidobro, A. and Fouad Mohamed, G. (2006) Evaluation of two quality índices related to ice storage and sensory analysis in farmed gilthead seabream and seabass. *Food Sci.Technol.Int.*, 12(3):261-268.

Teklemariam, A. D., Tessema, F., and Abayneh, T. (2015). Review on evaluation of safety of fish and fish products. *Int. J. Fish. Aquat. Stud*, 3(2):111-117.

Thuaud, D.; Beliard, M.; Le Guern, J. and Bourgeois, C.M. (1991) Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* by Bacteriocin-Like Substances Produced by Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science*, 74(4):1145-1150

Tilve-Jar, C.; Rodríguez, C.J.; Besteiro, I. and Pascual, C. (1996) Estudio comparativo de aminos durante el deterioro de túnidos. *Alimentaria*, 278:121-124.

Tokunaga, T. (1975a). On the thermal decomposition of trimethylamine oxide in muscle of some marine animals. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 41:535-546.

Tokunaga, T. (1975b). Studies on the quality evaluation of canned marine products. I. Determination of the ratio of dimethylamine to trimethylamine in canned albacore.. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 41:547-553.

Tokunaga, T., Iida, H., Nakamura, K., Terano, S., Furukawa, T., Sato, K. (1982). Study of the several chemical tests for estimating the

quality of canned product-I. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.*, 107:79-88.

Toldrá, F., and Reig, M. (2011). The stability and shelf life of seafood. En *Food and Beverage Stability and Shelf Life*. Pag: 779-792.

Tomac, A., and Yeannes, M. I. (2015). Quality Changes in Gamma Irradiated Marinades of Anchovy (*Engraulis anchoita*) During Refrigerated Storage. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 24(7):686-697.

Tomasevic, I., and Rajkovic, A. (2015). The sensory quality of meat, game, poultry, seafood and meat products as affected by intense light pulses: A systematic review. *Procedia Food Science*, 5:285-288.

Torido, Y., Takahashi, H., Kuda, T. and Kimura, B. (2012). Analysis of the growth of histamine-producing bacteria and histamine accumulation in fish during storage at low temperatures. *Food Control*, 26:174-177.

Tou, J. C., Jaczynski, J., and Chen, Y. C. (2007). Krill for human consumption: nutritional value and potential health benefits. *Nutrition Reviews*, 65(2):63-77.

Tozawa, H., Enokibara, K., and Amano, K. (1970). Effect of dimethylamine on the value of trimethylamine determined by Dyer's method. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 36(606):606-.

Triqui, R. and Bouchitri, N. (2003) Freshness assessment of Moroccan sardine (*Sardina pilchardus*): comparison of overall sensory changes to instrumentally determinate volatiles. *J. Agric. Food Chem.*, 51:7540-7546.

Triqui, R., and Bouchriti, N. (2003). Freshness assessments of Moroccan sardine (*Sardina pilchardus*): comparison of overall sensory changes to instrumentally determined volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(26):7540-7546.

Tsai, Y.H., Kung, H.F., Lee, T.M., Chen, H.C., Chou, S.S., Wei, C.I. and Hwang, D.F. (2005) Determination of histamine in canned mackerel implicated in a food borne poisoning. *Food Control*, 16:579-585.

Tsuchimoto, M., Misina, T., Utsugi, T., Kitajima, S., Yada, S., Senta, T. and Yasuda, M. (1988a) Resolution characteristics of ATP-

related compounds in fishes from several waters and the effect of habitat temperatures on the characters. *Nip. Sui.Gak.*, 54:683-689.

Tsuchimoto, M., Tanaka, N., Utsugi, T., Misina, T., Tachibana, T., Yada, S., Senta, T. and Yasuda, M. (1988b) The influence of rearing water temperature on the relative thermostability of myofibrillar Ca^{2+} -ATPase and on the lowering speed of freshness in carp. *Nip. Sui.Gak.*, 54:117-122.

Tsuchimoto, M., Yamaga, T., Lee, K. H., Wu, Z., Misima, T., and Tachibana, K. (1998). The influence of Ca^{2+} concentration around myofibrillar Mg^{2+} -ATPase on the speed and pattern of rigor mortis in fish species or cultured and wild fish. *Fisheries Science*, 64(1):148-154.

Tzikas, Z., Amvrosiadis, I., Soultos, N., and Georgakis, S. (2007). Seasonal variation in the chemical composition and microbiological condition of Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) muscle from the North Aegean Sea (Greece). *Food Control*, 18(3):251-257.

Uddin, M., Ishizaki, S., Okazaki, E., and Tanaka, M. (2002). Near-infrared reflectance spectroscopy for determining end-point temperature of heated fish and shellfish meats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(3):286-292.

Uddin, M., Okazaki, E., Ahmad, M. U., Fukuda, Y., and Tanaka, M. (2006). NIR spectroscopy: A non-destructive fast technique to verify heat treatment of fish-meat gel. *Food Control*, 17(8):660-664.

UE (2005) REGLAMENTO (CE) no 2073/2005 DE LA COMISIÓN de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

UE (2008) Reglamento (CE) nº 1022/2008 de la Comisión, de 17 de octubre de 2008, por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 2074/2005 en lo que respecta a los valores límite de nitrógeno básico volátil total (NBVT). Ante dudas en el análisis sensorial, establece límites según grupos de pescado.

UE (2013) REGLAMENTO (UE) No 1019/2013 DE LA COMISIÓN de 23 de octubre de 2013 que modifica el anexo I del Reglamento (CE) no 2073/2005 en lo relativo a la histamina en los productos de la pesca.

Ueda, Y., and Fukami, K. (2017). Flavor Constituents in Savory Seafood: Dried Kelp (Kombu), Scallop, and Dried Bonito (Katsuobushi). *Aqua-Bioscience Monographs* ABMS, 10(1):1-22.

Ulrich, C., Le Gallic, B., Dunn, M. R., and Gascuel, D. (2002). A multi-species multi-fleet bioeconomic simulation model for the English Channel artisanal fisheries. *Fisheries Research*, 58(3):379-401.

Undeland, I., Ekstrand, B., and Lingnert, H. (1998). Lipid oxidation in herring (*Clupea harengus*) light muscle, dark muscle, and skin, stored separately or as intact fillets. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(5):581-590.

Undeland, I., Hall, G. and Lingnert, H. (1999) Lipid oxidation in fillets of herring (*Clupea harengus*) during iced storage. *J.Agric.Food Chem.*, 47:524-532.

Uriarte-Montoya, M.H., Villalba-Villalba, A.G., Pacheco-Aguilar, R., Ramírez-Suárez, J.C., Lugo-Sánchez, M.E., García-Sánchez, G. and Carvallo-Ruíz, M.G. (2010) Changes in quality parameters of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) muscle during the canning process. *Food Chem.*, 122:482-487.

Ushio, H., Watabe, S., Iwamoto, M., and Hashimoto, K. (1991). Ultrastructural evidence for temperature-dependent Ca^{2+} release from fish sarcoplasmic reticulum during rigor mortis. *Food Structure*, 10(3):9-.

Valls, J.E. and Delgado, A.B. (2000) Evaluation of ATP degradation products in sardine (*Sardinella aurita*) during ice storage. *Rev. Cient. Fac. Cien. Vet.*, 10(5):383-390.

Valls, J.E. and Paredes, A. (2010) Physical and chemical characterization of the sardine (*Sardinella aurita*). *Rev.Cien.Fac.Cien.Vet.*, 20:546-554.

Varlet, V. and Fernandez, X. (2010) Review. Sulfur containing volatile compounds in seafood: occurrence, odorant properties and mechanisms of formation. *Food Sci. Tech. Int.*, 16(6):0463-0464.

Vazquez-Ortiz, F. A., Pacheco-Aguilar, R., Lugo-Sanchez, M. E., and Villegas-Ozuna, R. E. (1997). Application of the freshness quality index (K value) for fresh fish to canned sardines from Northwestern Mexico. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10(2):158-165.

Veciana, M.T., Bover, S., Mariné, A. and Vidal, M.C. (2004) Biogenic amine production by *Morganella morganii* and *Klebsiella oxytoca* in tuna. *Eur. Food Res. Technol.*, 218:284-288.

Veciana, M.T., Vidal-Carou, M.C. and Mariné, A. (1989) Histamine and tyramine in preserved and semipreserved fish products. *J. Food Sci.*, 54(6):1653-1655.

Veciana-Nogues, M.T. (1993) *Aminas biógenas y otros parámetros relacionados con la alteración bacteriana del pescado. Estudio de su evolución y significación en la elaboración de derivados*. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona.

Veciana-Nogues, M.T., Hernández-Jover, T., Mariné-Font, A. and Vidal-Carou, M.C. (1995) Liquid chromatographic method for determination of biogenic amines in fish and fish products. *J. AOAC Int.*, 78(4):1045-1050.

Veciana-Nogués, M.T., Izquierdo-Pulido, M. and Vidal-Carou, M.C. (1997b) Determination of ATP related compounds in fresh and canned tuna fish by HPLC. *Food Chem.*, 59(3):467-472.

Veciana-Nogués, M.T., Mariné-Font, A. and Vidal-Carou, M.C. (1997a) Biogenic amines in fresh and canned tuna. Effects of canning on biogenic amine contents. *J. Agric. Food Chem.*, 45:4324-4328.

Venkateshwarlu, G., Let, M. B., Meyer, A. S., and Jacobsen, C. (2004). Modeling the sensory impact of defined combinations of volatile lipid oxidation products on fishy and metallic off-flavors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6):1635-1641.

Venugopal, V., and Shahidi, F. (1996). Structure and composition of fish muscle. *Food Reviews International*, 12(2):175-197.

Verbeke, W., Vermeir, I., and Brunsø, K. (2007). Consumer evaluation of fish quality as basis for fish market segmentation. *Food Quality and Preference*, 18(4):651-661.

Verkhivker, Y., and Altman, E. (2018). Influence Parameters of Storage on Process of Formation the Histamine in Fish and Fish Products. *Journal of Water Resources and Ocean Science*, 7(1):10-14.

Vicario, I.M., Guillén, R. y Guzmán, M. (1997) Utilización del ensayo del ácido 2-tiobarbiturico (ATB) para evaluar el proceso autoxidativo en alimentos. *Grasas y Aceites*, 48:96-102.

Vilas, C., Alonso, A. A., Herrera, J. R., García-Blanco, A., and García, M. R. (2017). A model for the biochemical degradation of inosine monophosphate in hake (*Merluccius merluccius*). *Journal of Food Engineering*, 200:95-101.

Villamor, B., Abaunza, P., Lucio, P., and Porteiro, C. (1997). Distribution and age structure of mackerel (*Scomber scombrus*, L.) and horse mackerel (*Trachurus trachurus*, L.) in the northern coast of Spain, 1989-1994. *Scientia Marina*, 61:345-366.

Visciano, P., Campana, G., Annunziata, L., Vergara, A. and Ianieri, A. (2007) Effect of storage temperature on histamine formation in *Sardina pilchardus* and *Engraulis encrasicolus* after catch. *J.Food Biochem.*, 31:577-588.

Visciano, P., Schirone, M., Tofalo, R., and Suzzi, G. (2012). Biogenic amines in raw and processed seafood. *Frontiers in Microbiology*, 3:1-9.

Wakao, A.W. and Palma-Estrada, J. (1983). Freshness evaluation in sardine and jack mackerel using K value and nitrogenated volatilebases. *Aquaculture* 76(1-2):135-143.

Wang, B., Mahoney, N. E., Pan, Z., Khir, R., Wu, B., Ma, H., and Zhao, L. (2016). Effectiveness of pulsed light treatment for degradation and detoxification of aflatoxin B1 and B2 in rough rice and rice bran. *Food Control*, 59:461-467.

Wang, F., Fu, L., Bao, X., and Wang, Y. (2017). The spoilage microorganisms in seafood with the existed quorum sensing phenomenon. *Journal of Food Microbiology*, 1(1).

Wang, Y., Li, C., Li, L., Yang, X., Wu, Y., Zhao, Y., and Wei, Y. (2018). Effect of bacterial community and free amino acids on the content of biogenic amines during fermentation of Yu-lu, a chinese fermented fish sauce. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 1-12.

Watabe, S., Kamal, M. and Hashimoto, K. (1989). Changes in Ca^{2+} -ATPase activity of sardine ordinary and dark muscle myofibrils during storage at various pH values. *Nip.Sui.Gak.*, 55:703-707.

Watabe, S., Kamal, M., and Hashimoto, K. (1991). Postmortem changes in ATP, creatine phosphate, and lactate in sardine muscle. *Journal of Food Science*, 56(1):151-153.

Watanabe, E., Tamada, Y. and Hamada-Sato, N. (2005) Development of quality evaluation sensor for fish freshness control based on K_1 Value. *Biosens. Bioelectron.*, 21:534-538.

Watanabe, H. (1974) Determination of carbonyl value of fats and oils. *Fish. Res. Bd. Can. Trans.*, 22:373-378.

Waterman, J.J. and Taylor, D.H. (2001) Superchilling. Torry Advisory Note n°32. Torry Research Station, UK. FAO in partnership with Support Unit for International Fisheries and Aquatic Research, SIFAR.

Watts, B. M., Ylimaki, G. L., Jeffery, L. E., and Elías, L. G. (1992). Métodos sensoriales básicos para la evaluación de alimentos. CIID, Ottawa.

Weber, F.C. and Wilson, J.B. (1919) The formation of ammonia and amines on canned sardines during storage. *J. Industrial Eng. Chem.*, 11(2):121-126.

Wei, C.I., Chen, C.M., Koburger, J.A., Otwell, W.S. and Marshall, M.R. (1990) Bacterial growth and histamine production on vacuum packaged tuna. *J. Food Sci.*, 55:59-63.

Wendakoon, C. N., and Sakaguchi, M. (1993). Combined effect of sodium chloride and clove on growth and biogenic amine formation of *Enterobacter aerogenes* in mackerel muscle extract. *Journal of Food Protection*, 56(5):410-413.

Wesson, J. B., Lindsay, R.C., and Stuibier, D.A. (1979). Discrimination of fish and seafood quality by consumer populations. *Journal of Food Science*, 44(3):878-882.

Wold, J. P., Kermit, M., and Woll, A. (2010). Rapid nondestructive determination of edible meat content in crabs (*Cancer pagurus*) by near-infrared imaging spectroscopy. *Applied spectroscopy*, 64(7):691-699.

Wong, K., Bartlett, P. and Gill, T.A. (1988). A diagnostic test strip for the semiquantitative determination of trimethylamine in fish. *J. Food Sci.*, 53:1653-1656.

Wootton, M., Silalahi, J. and Wills, R.B. (1989). Amine levels in some asian seafood products. *J. Sci. Food Agric.*, 49:503-506.

Xunta de Galicia (2013) Estadísticas pesqueras relacionadas con la especie *Sardina pilchardus*, www.pescagalicia.com, datos obtenidos a 15 julio de 2013

Yada, O., Tsuchimoto, :, Wang, Q., Apablaza, P.A.G., Jabarsyah, A. and Tachibana, K. (2000) Differences of muscle fiber type and temporal change of K-value among parts toward depth of dorsal muscle in carp (cultured). *Fish. Sci.*, 66:147-152.

Yamamoto, Y. and Imose, K., (1989) Changes in fatty acid composition in sardines (*sardinops melanosticta*) with cooking and refrigerated storage. *J. Nutr. Sci. Vitamin.*, 35:39-47.

Yamanaka, H., and Matsumoto, M. (1989). Simultaneous determination of polyamines in red meat fishes by high performance liquid chromatography and evaluation of freshness. *Food Hygiene and Safety Science* (Shokuhin Eiseigaku Zasshi),30(5):396-400.

Yamanaka, H., Itagaki, K., Shiomi, K., Kikuchi, T. and Okuzumi, M. (1985) Influences of the concentration of sodium chloride on the formation of histamine in the meat mackerel. *J. Tokyo Univ.Fish.*, 72(2):51-56.

Yamanaka, H., Shimakura, K., Shiomi, K. and Kikuchi, T. (1986) Changes in non-volatile amine contents of the meats of sardine and saury pike during storage. *Bull.Jap.Soc.Sci.Fish.*, 52(1):127-130.

Yamanaka, H., Shiomi, K. and Kikuchi, T. (1989) Cadaverine as a potential index for decomposition of salmonoid fishes. *J. Food Hyg. Soc. Jap.*, 30(2):170-174.

Yapara, A. and Yetimb, H. (1998) Determination of anchovy freshness by refractive index of eye fluid. *Food Res. Int.*, 31:693-695.

Yazdekhosti, N., Brandsch, C., Schmidt, N., Schloesser, A., Huebbe, P., Rimbach, G., and Stangl, G. I. (2016). Fish protein increases circulating levels of trimethylamine-N-oxide and accelerates aortic lesion formation in apoE null mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60(2):358-368.

Yeannes, M. I. (1988). Determinación de tiempos de esterilización en conservas de pescado. *Revista de Ciencias Agrarias y Tecnología de Alimentos*, 9(1-4):5-17.

Yen, G. and Hsieh, C.H. (1991). Simultaneous analysis of biogenic amines in canned fish by HPLC. *J.Food Sci.*, 56:158-160.

Yerlikaya, P., Gokoglu, N., and Uran, H. (2005). Quality changes of fish patties produced from anchovy during refrigerated storage. *European Food Research and Technology*, 220(3-4):287-291.

Yoshinaga, D.H. and Frank, H.A. (1982) Histamine-producing bacteria in decomposing skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 44:447-452.

Zakipour-Rahimabadi, E., Rigi, M. and Rahnama, M. (2013) Combined effects of *Zataria multiflora* boiss essential oil and nisin on the shelf-life of refrigerated rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) fillets. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 12(1) 115-126.

Zand, N., Mohammadi, A. S., and Eshaghi, M. R. (2016). Influence of MAP and Multi-layer Flexible Pouches on *Clostridium* Count of Smoked Kutum Fish (*Rutilus frisii kutum*). *International Journal of Medical Research and Health Sciences*, 5(11), 191-198

Zare, D., Muhammad, K., Bejo, M. H., and Ghazali, H. M. (2013). Changes in urocanic acid, histamine, putrescine and cadaverine levels in Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) during storage at different temperatures. *Food Chemistry*, 139(1-4):320-325.

Zare, D., Muhammad, K., Bejo, M. H., and Ghazali, H. M. (2015). Determination of urocanic acid, a compound implicated in histamine toxicity, and assessment of biogenic amines relative to urocanic acid content in selected fish and fish products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 37:95-103.

Zhang, S. X., Farouk, M. M., Young, O. A., Wieliczko, K. J., and Podmore, C. (2005). Functional stability of frozen normal and high pH beef. *Meat Science*, 69(4):765-772.

Zhang, Z., Li, G., Luo, L., and Chen, G. (2010). Study on seafood volatile profile characteristics during storage and its potential use for freshness evaluation by headspace solid phase microextraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 659(1-2):151-158.

Zheng, Z., Lin, S., Xue, J., Shen, Q., Feng, J., Jin, R., and Dai, Z. (2016). The Characterization of Myoglobin and Myoglobin-Induced Lipid Oxidation in Frigate Mackerel. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(6):1438-1447.

Zhu, J., Li, J., and Jia, J. (2012b). Effects of thermal processing and various chemical substances on formaldehyde and dimethylamine formation in squid *Dosidicus gigas*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(12):2436-2442.

Zur-Nedden, S. Eason, R., Doney, A.S. and Frenguelli, B.G. (2009) An ion-pair reversed-phase HPLC method for determination of fresh tissue adenine nucleotides avoiding freeze-thaw degradation of ATP. *Anal. Biochem.*, 388:108-114.





